

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIA TEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Kristiina Patrael

**Maksa tüvirakkude pinnamarkerite ja neid ümbritseva  
ekstratsellulaarse matriksi iseloomustamine normaalses ja  
kahjustatud koes**

Magistritöö

Juhendaja: Viljar Jaks, Ph.D.

TARTU 2014

# SISUKORD

SISUKORD .....	2
KASUTATUD LÜHENDID .....	3
SISSEJUHATUS .....	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	5
1.1. Maksa ehitus .....	5
1.2. Maksarakud maksa regeneratsioonis .....	6
1.3. Maksa tüvirakud .....	8
1.3.1. Maksa tüvirakkude identifitseerimine .....	9
1.4. Ekstratsellulaarne maatriks .....	11
1.4.1. Basaalmembraanide ehitus ja funktsioonid .....	12
1.4.1.1. Basaalmembraan.....	12
1.4.1.2. Basaalmembraani funktsioonid.....	14
1.4.1.3. Laminiinid.....	14
1.4.2. Tüviraku niši olemus .....	16
2. EKSPERIMENTAALNE OSA .....	19
2.1. Töö eesmärgid.....	19
2.2. Materjalid ja metoodika .....	20
2.2.1. Hiirte käsitletus.....	20
2.2.2. Külmutatud koeproovid.....	20
2.2.3. Koelõikude lõikamine .....	20
2.2.4. Immunovärvimine .....	20
2.2.5. Mikroskoopiline analüüs .....	21
2.2.6. Kasutatud antikehad .....	22
2.3. Tulemused.....	23
2.3.1. Testitud maksa tüviraku markerid .....	23
2.3.2. Maksa tüviraku markerite kolokalisatsiooni hindamine CK19-ne suhtes ....	31
2.3.3. Laminiinide ekspressioonimuster tüviraku nišis .....	34
ARUTELU .....	39
KOKKUVÕTE .....	42
SUMMARY .....	43
KASUTATUD KIRJANDUS .....	45

## KASUTATUD LÜHENDID

2-AAF - *2-acetylaminofluorene*, 2-atsetüülaminofluoreen

ALB - *albumin*, albumin

BM - *basement membrane*, basaalmembraan

CCl<sub>4</sub> - *carbon tetrachloride*, tetraklormetaan

CD - *cluster of differentiation*, diferentseerumise klaster

CDE - *ethionine-supplemented diet*, koliinivaese etioniiniga dieet

CK19 - *cytokeratin-19*, tsütokeratiin-19

DAPI - *4',6-diamidino-2-phenylindole*, 4',6-diamidino-2-fenüülindool

DDC - *3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydro-collidin diet*, 3,5-dietoksükarbonüül-1,4-dihüdro-kollidiini dieet

Dlk1 - *protein delta homolog 1*, delta-sarnane proteiin 1

E - *embryonic day*, embrüonaalne arengupäev

EGF - *epidermal growth factor*, epidermaalne kasvufaktor

EM - *the extracellular matrix*, ekstratsellulaarne maatriks

EpCAM - *epithelial cell adhesion molecule*, epiteelraku adhesioonimolekul

HCC - *hepatocellular carcinoma*, hepatotsellulaarne kartsinoom

HMG - *high mobility group*, kõrge mobiilsusega rühm

HSC - *hematopoietic stem cell*, hematopoeetiline tüvirakk

LM - *laminin*, laminiin

NPLC - *non-parenchymal liver cells*, mitte-parenhüümirakud

PBS - *phosphate buffered saline*, naatrium-fosfaatpuhvri lahus

PH - *partial hepatectomy*, osaline hepatektoomia

TROP-2 - *tumor-associated calcium signal transducer 2*

Tween 20 - *polysorbate 20*, polüoksüetüleen(20) sorbitaan monolauraat

## SISSEJUHATUS

Maksavähk on ravimatu haigus, mille ainsaks tervistavaks raviviisiks on maksa transplantatsioon. Maksakasvaja tekib peamiselt kärbunud ja tsirrootilises maksas, mis on paljude krooniliste maksahaiguste viimaseks faasiks. Nii maksatsirroos kui ka maksavähk tulenevad maksa tüvirakkude regulatsiooni häiretest. Tsiirroosi puhul on nende jagunemine peetunud, samal ajal kui maksakasvajate puhul omandab üks või mitu maksarakkude kloonid kontrollimatu jagunemise võime. Maksa tüvirakkude aktiivsust reguleerib maksa mikrokeskkond mitmel viisil: lahustuvate signaalmolekulide (tsütokiinid, kasvufaktorid jt), vahetu füüsilise keskkonna, naaberrakkude ning ekstratsellulaarse matriksi (EM) muutuste kaudu.

Ekstratsellulaarne matriks on rakkude mikrokeskkonna aluskomponent ning pakub palju rohkem kui üksnes mehaanilist tuge ja substraati rakuadhesiooniks, omades olulist regulatiivset rolli basaalmembraanis, tüvirakkude niššides ja kasvajates. Kõik epiteelirakud on vähemalt osa oma elutsüklis seotud basaalmembraaniga ja kõik tüvirakkude nišid sisaldavad EM-i. EM-i ehitus ja korraldus muutub kasvajate tekkel ulatuslikult ning see mõjutab kasvaja- ja stroomarakkude elulemust, levikut ja teisi omadusi.

Maksasiirdamine on hetkel ainuke võimalus ravida lõppstaadiumis maksahaigusi. Doonorelundide kättesaadavus ei vasta praegusele nõudlusele ning paljud patsiendid surevad oodates sobivat elundit. Seega on hädavajalik arendada kroonilise kahjustusega maksa taastamiseks vajalikke protseduure. Maksa taastamisprotsesside arengu kiirendamiseks peavad ravistrateegiad keskenduma lisaks tüvirakkude aktiveerimisele ka rakuväliste võrgustike ümberkujundamisele.

Käesoleva uurimistöö peamiseks ülesandeks on kirjeldada maksa tüvirakkude pinnamarkerite repertuaari ja nende niši ekstratsellulaarset matriksit normaalses maksas ning selle muutusi maksakahjustuse tekkel. Antud töö on aluseks edasisele uurimisele, mis jätkab EM-i muutuste kirjeldamist maksatsirroosi ja maksakasvajate puhul kasutades hiirt mudelorganismina, aga ka inimese maksa uuringutes.

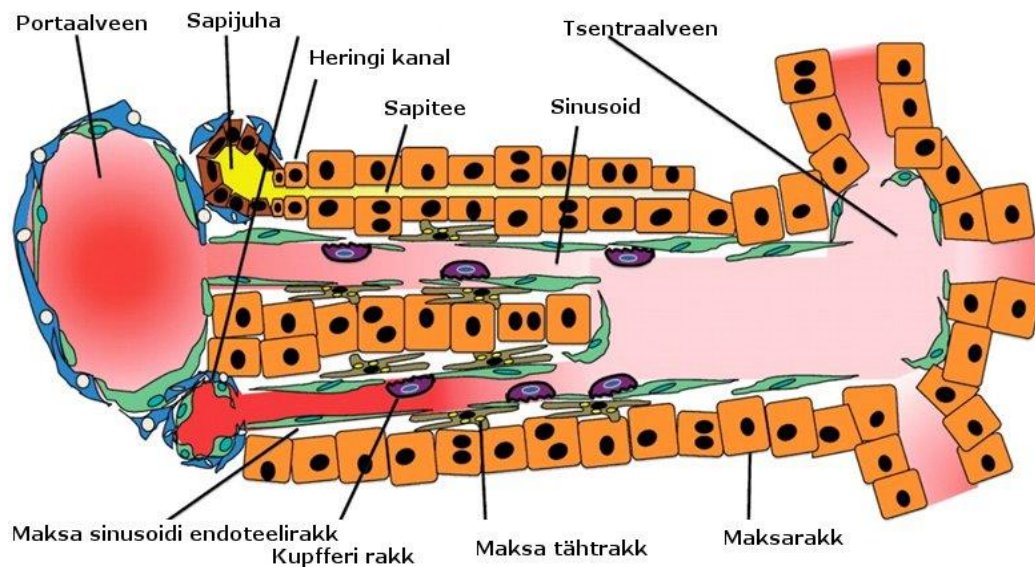
# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Maksa ehitus

Maksa parenhüüm on jagatud maksasagarikeks (joonis 1). Maksasagarikud koosnevad retikulaarsidekoelisest toestikust ja epiteliaalseist maksarakkudest. Sagariku perimeetris asuv maksaportaali koosneb väiksest portaalveenist, maksaarterist ja sapijuhast. Maksaarter varustab maksa hapnikurikka verega (Smithuis, 2014). Veri siseneb maksa portaalveeni ja maksaarteri kaudu voolates läbi maksa sinusoidide tsentraalveeni poole. Maksarakud ehk hepatotsüüdid on organiseeritud imetajates ühe rakukihi paksustesse maksaplaatidesse, mida eraldavad sinusoidid. Hepatotsüüdid vastutavad maksa ainevahetusfunktsioonide eest ning moodustavad 60% maksa kõigist rakkudest ja annavad 80% maksa kogukaalust. Maksarakud paiknevad sagarikus tsentraalveeni ümber ja on vahetus kontaktis kapillaaristikuga. Maksarakkudest moodustunud väärtide sisemuses moodustub sekretoorne sapikapillaaride võrgustik (Celton-Morizur jt., 2010).

Basolateraalset on hepatotsüüdid kaetud kapillaaride unikaalse pilutatud endoteeliga, mis moodustab sinusoidi voolusooned. Need sooned tagavad ainevahetuse vere ja hepatotsüütide vahel. Maksa sinusoidid koosnevad kapillaaridest, mis on ümbritsetud pilutatud endoteelirakkudest, maksarakkudest, maksa strooma moodustavatest tähtrakkudest (Ito rakud), maksa makrofaagidest (Kupfferi rakud) ja suurtest granulaarsetest lümfotsüütidest (loomulikud tapjarakud) (Kmieć, 2001).

Hepatotsüütide tipmised küljed moodustavad sapijuhakesed. Maksa sagarikusisesed sapikapillaarid algavad sagariku keskmest ning kulgevad radiaalselt sagariku pinna suunas. Sagariku pinnale suubudes koonduvad nad sagarikevahejuhakesteks, mis on vooderdatud mittesekretoorsete kuubiliste valkudega. Hepatotsüüdid eritavad sapi sapijuhakestesse ning see juhitakse edasi sapijuhadesse, mis on vooderdatud sapijuha epiteelirakkudega. Sapijuhad on moodustunud sapiteede epiteelrakkudest ehk kolangiotsüütidest (Desmet, 1994).



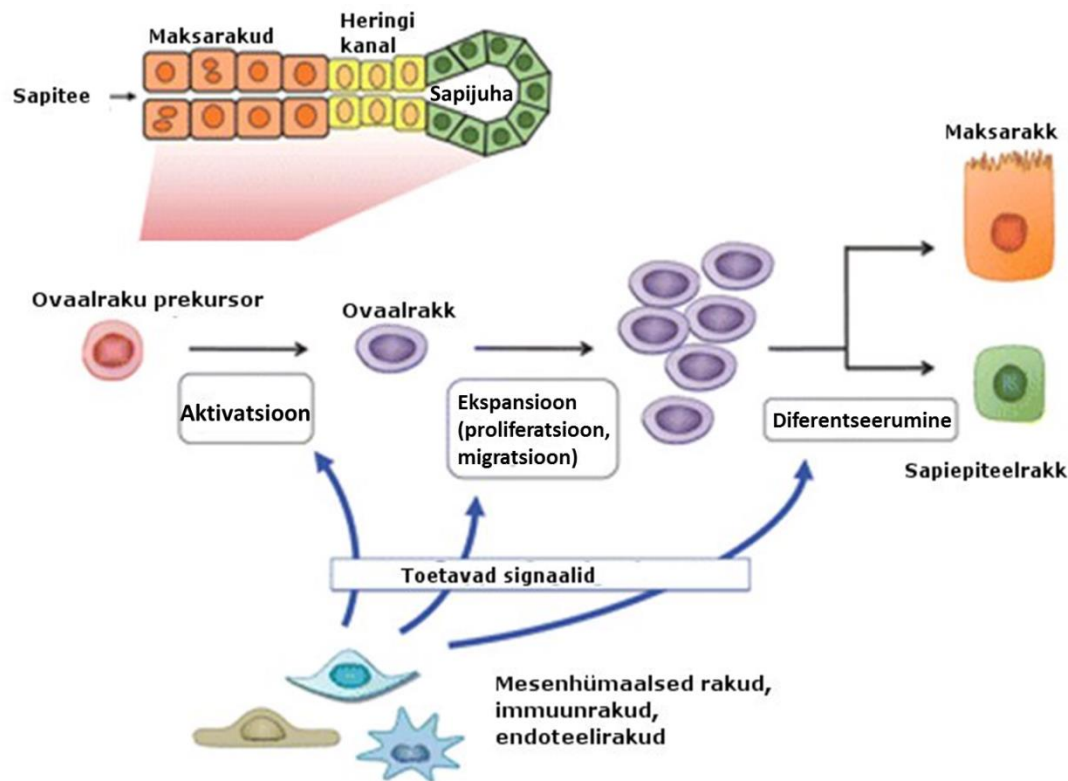
**Joonis 1. Maksa ehitus.** Maksas voolab veri portaalveresoontest läbi sinusoidide tsentraalveenidesse. Maksa sinusoidid on maksale omased kapillaarid, mis on ümbritsetud pilutatud endoteelirakkudest, maksa tähtrakkudest (Ito rakud) ja maksa-omastest makrofaagidest (Kupfferi rakud). Maksarakud on polariseeritud epiteelirakud, mis moodustavad maksaväite ja nendevahelisi sinusoide, mis koonduvad tsentraalveeni suunas. Hepatotsüütides toodetud sapp eritub kanalikestesse, mis suubuvad sapijuhadesse. Piirkonda, mis ühendab sapijuhakesi sapiteedega nimetatakse "Heringi kanaliteks" (muudetud, Tanaka jt., 2011).

## 1.2. Maksarakud maksa regeneratsioonis

Hoolimata sellest, et maks on suhteliselt inaktiivne elund on tal tohtu taastumisvõime pärast suuri kahjustusi nagu osaline hepatektoomia (*partial hepatectomy*, PH, ingl. k.) või toksiline kahjustus. Maksa kahel peamisel rakutüübil, maksarakkudel ja sapiepiteelirakudel, on märkimisväärne regeneratsioonivõime (Wilson ja Leduc, 1958). Tavaolukorras maksarakud ei prolifereeru, kuid on teada, et hepatotsüüdid omavad märkimisväärset paljunemise võimet maksakoe taastamiseks (Michalopoulos, 2010) ning on võimelised 80 korda jagunema järjestikustel maksarakkude siirdamistel (Overturf jt., 1997). Pärast osalist maksa eemaldamist toimub maksa taastumine tänu epiteliaalsetele kogumitele (maksarakud ja kolangiotsüüdid), millele järgneb mesenhüümirakkude (maksa tähtrakkud ja endoteelirakud) proliferatsioon. Kui maksa küpsed epiteelirakkude kogumid, maksarakud ja/või sapiteede rakud, saavad kahjustatud või replikatsiooni ajal inhibeeritakse, siis aktiveeruvad rakkude varukogumid (Roskams jt., 2003a; Roskams jt., 2003b). Prolifereeruvaid epiteelrakke, mida inimestel nimetatakse eellasrakkude kogumiks ja rottidel

ovaalrakkude kogumiks (Farber, 1956) ning mis paiknevad Heringi kanalites (Roskams jt., 2004). Periportaalse ala selektiivsel kahjustumisel väheneb ovaalrakkude proliferatsioon, mis toetab arusaama, et ovaalrakud pärinevad periportaalsest piirkonnast ning eelkõige Hering'i kanalitest, mis ühendavad sapijuhakesi ja suuri sapiteid (Paku jt., 2001). Kuigi ovaalrakke on kõige põhjalikumalt uuritud närilistel, on sarnaseid rakke leitud ka inimese erinevate maksahaiguste korral nagu krooniline viirushepatiit, alkoholne maksahaigus, mittealkohoolne rasvmaks ja fulminantne hepatiit ning samuti on nad seotud tumorigeneesiga (Petersen jt., 1999; Theise jt., 1999; Fausto, 2004; Alison jt., 2009). Raku pinnamarkerite ekspressioonimustrite võrdlus viitab võimalusele, et ovaalrakkude rakuliinid sarnanevad hepatoblastide tunnustele maksa arengu varastes etappides. Seega võib ovaalrakke lugeda maksa parenhüümi "bipotentsiaalseteks prekursoriteks" (Floridon jt., 2000). Ovaalrakud ekspresseerivad nii albumiini (*albumin*, ALB, ingl. k.) kui tsütokeratiin-19t (*cytokeratin-19*, CK19, ingl. k.), mis on vastavalt hepatotsüütilised ja kolangiotsüütilised markerid ning usutakse nende diferentseerumist maksa parenhüümi ja sapiteede rakutüüpideks, mis meenutab hepatoblaste embrüonaalses maksas. Seega on need arvatavasti täiskasvanud maksas fakultatiivsed tüvi/eellasrakud (Tanaka jt., 2011) (joonis 2).

Maksatransplantatsiooni üha suurenev kasutamine ja edukus kliinilises meditsiinis näitab, et katsed loomadega peegeldavad õigesti inimese maksa taastumisvõimet (Lajtha, 1970). Kuna täiskasvanud organismis on mitmeid erinevaid tüvirakkude liike, mis võivad diferentseeruda erinevates etappides ning millel on väga erinev suutlikkus genereerida erinevaid järglasrakuliine, on maksa tüvirakkude roll maksa taastamisel olnud küsitav.



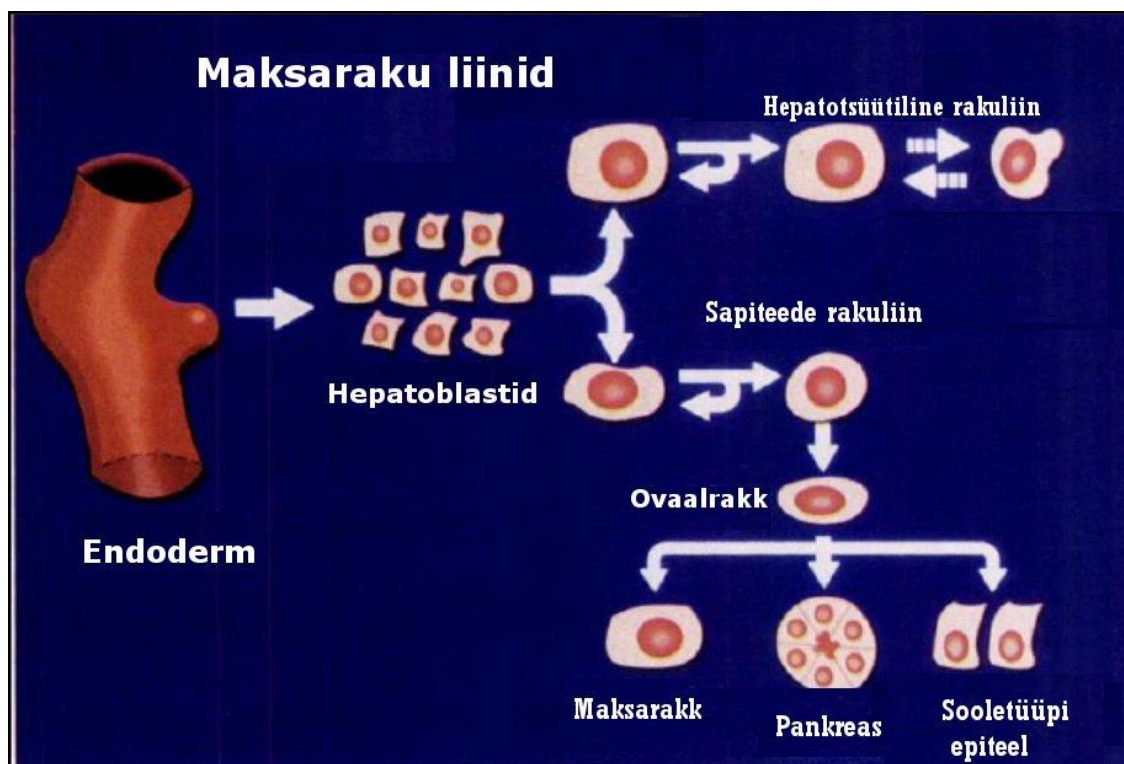
**Joonis 2. Ovaalrakkude induktsioon** (muudetud, Tanaka jt., 2011).

### 1.3. Maksa tüvirakud

Tüvirakkude põhiline ühine tunnus on enesetaastamisvõime (Rhim jt., 1994) ja võime moodustada kõiki antud koes esinevaid rakutüüpe. Tõeliste tüvirakkudena defineeritakse mittediferentseerunud rakke, mis on võimelised 1) prolifereeruma, 2) ennast taastama, 3) tootma suurt hulka diferentseerunud järglasrakke ning 4) taastama koe pärast vigastust (Potten ja Loeffler, 1990). „Tüvirakulisuse“ definitsioonist ilmneb, et maksarakud on „tegutsevad tüvirakud“, mis tavaliselt on vaiksed, kuid võivad aktiveeruda ning toota järglasi, mille ainus diferentseerumisvõimalus on maksarakuks küpsemine (Grisham ja Thorgeirsson, 1996). Maksa tuleb käsitleda kui kahte tüüpi tüvirakkude süsteemi: unipotentsiaalsed tegutsevad tüvirakud (maksarakud) ning multipotentsiaalsed mitteparenümaalsed epiteliaalsed (duktulaarsed) süsteemid (joonis 3). Maksa tüvirakkude olemasolu fakti toetavad ka maksa kartsinogeneesi uuringute andmed (Fausto, 1990; Sell, 1990; Marceau, 1990; Sigal jt., 1992). Sarnaste rakkude olemasolust on teatatud ka inimese maksas (Lemire jt., 1991; Hsia jt., 1992). Maksa tüvirakud panevad organogeneesi käigus



aluse kahte tüüpi maksa epiteelrakkudele - maksarakkudele ja sapiteede rakkudele (Dan jt., 2006). Kuigi maksa tüvirakkude kohta on palju uuringuid, on maksa tüviraku definitsioon küllaltki laialivalgus. Kuna tüvirakkude eristamine eellasrakkudest on nende piiramatult taastumisvõime tõendamise alusel paljudel juhtudel keeruline, siis kasutatakse käesolevas ülevaates nende kohta terminit tüvi/eellasrakud (Chistiakov, 2012).



**Joonis 3.** Skemaatiline diagramm, mis näitab rakuliinide arengut maksas (muudetud, Zorn, 2008).

### 1.3.1. Maksa tüvirakkude identifitseerimine

Antikehade abil märgistatud rakkude sorteerimine on paljulubav meetod eri tüüpi rakkude isoleerimiseks ja kirjeldamiseks ning seda on katsetatud ka maksa tüvirakkudele spetsiifiliste rakupinna antigeenide määramiseks. On näidatud, et sorteeritud E11.5 (embrüonaalne arengupäev) maksarakkude kolooniaid moodustavates proovides EpCAM<sup>+</sup>Dlk1<sup>+</sup> (epiteelraku adhesioonimolekuli ja delta-sarnast proteiini 1 ekspresseeriv) rakupopulatsioon sisaldab *in vitro* kolooniaid moodustavaid rakke, mis viitab maksa

tüvirakkude esinemisele selles rakupopulatsioonis (Tanaka jt., 2009). Ovaalrakkude olemust maksa tüvirakkudena on käsitletud mitmetes erinevate näriliste mudelitega tehtud katsete uuringutes. 2-atsetüülaminofluoreen/PH (*2-acetylaminofluorene*, 2-AAF, ingl. k.) mudelit, mis hõlmab hepatotsüütide leviku blokeerimist 2-AAF-ga enne PH-d, on laialdaselt kasutatatud roti ovaalrakkude kirjeldamiseks (Evarts jt., 1987; Lee jt., 2006). Ovaalrakkude isoloomustamise suurimaks probleemiks on olnud nende määramiseks ja isoleerimiseks sobilike rakupinna markerite puudumine.

Rottide maksakahjustuse mudeli uurimisel leiti, et EpCAM<sup>+</sup> ovaalrakud on bipotentsiaalsed täiskasvanud maksa eellasrakud (Wang jt., 2003; Yovchev jt., 2007). Selleks, et isoleerida ja iseloomustada hiire ovaalrakke, otsisid Okabe ja kolleegid (Okabe jt., 2009) 3,5-dietoksükarbonüül-1,4-dihüdro-kollidiin (*3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydro-collidin*, DDC, ingl. k.) dieedil olnud hiirte maksarakkude pinnal ekspresseeritud molekule. Normaalse ja kahjustunud maksa EpCAM<sup>+</sup> rakkude kolooniate moodustamise võrdlemisel on leitud vähe erinevusi potentsiaalsetele maksa tüvirakkudele iseloomulike tegevusaktiivsuse näitajate vahel, mis annab kindla aluse oletada, et hiire prolifereruvad ovaalrakud esindavad pigem transitoorse võimekusega rakke (mitte tüvirakke).

Suzuki ja kolleegid (Suzuki jt., 2008) leidsid, et DDC-kahjustusega hiire maksast isoleeritud CD133<sup>+</sup> rakud võivad moodustada suuri rakukultuuride kolooniaid. Need suuri kolooniaid moodustavad rakud panevad aluse nii hepatotsüütide kui ka kolangiotsüütide arengule, säilitades seejuures diferentseerumata rakkudest koosnevaid iseuuenevaid rakudivisjone.

Mitteneoplastiliste maksakudede sapiepiteelis ekspresseeritakse püsivalt CD133 antigeeni (Suetsugu jt., 2006). On näidatud, et suurem osa mitteneoplastiliste maksakudede CD133<sup>+</sup> rakkudest olid CK19<sup>+</sup>. Histoloogilistes uuringutes on CD133 ekspressioon tihedalt seotud CK19 ekspressiooniga (Yin jt., 1997). CK19 ekspresseeritakse enamasti sapijuhades, sapijuhakestes ja Heringi kanalites. Seega saab CK19 kasutatada mitte ainult biliaarse, vaid ka tüvirakkude markerina. Maksarakkudega ümbritsetud väikseid duktaalseid struktuure (Heringi kanaleid) käsitletakse hetkel maksa tüvi- ja eellasrakkudena ning need struktuurid on ka CD133-positiivsed (Yoshikawa jt., 2009). CD133 ei ole üksnes eellasrakkude marker, vaid seda saab kasutada ka uudse biliaarse markerina (Seiichi jt., 2009).

Hepatotsellulaarse kartsinoomi (*hepatocellular carcinoma*, HCC, ingl. k.) koos ekspresseeritud raku pinnamarkerid nagu CD133, CD44 ja CD90, viitavad tüvi- ja eellasrakkude omadustele ning need antigeenid ekspresseeruvad ka põletikulises või peaaegu

normaalses maksakoes (Khuu jt., 2007; Mao jt., 2008). HCC proovid pärinesid patsientidelt, kes olid nakatunud kas HBV-ga (*hepatitis B virus*, ingl. k.) või HCV-ga (*hepatitis C virus*, ingl. k.) ning koos või ilma kaugelearenenud fibroosi või tsirroosita. Peaaegu kõik HCC-d ümbritsevate kudede proovid ning paljud hepatiidi proovid olid CD133, CD44 ja CD90 markerite suhtes positiivsed. Siiski, HCC normaalses koes, leiti positiivseid rakke peamiselt portaalaraladel ja fibroosseintes. On olemas ka võimalus, et tsirkuleerivad, luuüdist pärit CD44+ või CD90+ tüvirakud võisid suunduda põletikulisse maksakoesse ning osaleda koe taastamisel (Khuu jt., 2007).

Sox9, kõrge mobiilsusega rühma (*high mobility group*, HMG, ingl. k.) transkriptsioonitegurite hulka kuuluv valk mängib olulisi rolle embrüogeneesis ning selle aktiivsus on vajalik mitmete kudede, sealhulgas sooleepiteeli, maksa ja pankrease arenemiseks ja diferentseerumiseks (Matheu jt., 2012). Sox9 ekspresseeritakse üle kogu sapi- ja pankrease juhade epiteeli, mis on ühendab seedetrakti tüvirakkude tsooniga. On näidatud ka, et Sox9 on kui maksa tüviraku marker (Furuyama jt., 2011).

CD34 on vereloome tüvirakkude marker, mis normaalses inimese maksas tuvastati Heringi kanalites, kus eeldatavalt võivad asuda ka maksa tüvirakud (Surbek jt., 2000). CD24 ja P-kadheriin on raku adhesioonimolekulid (Li jt., 2009; Riener jt., 2010), mida on kirjeldatud ka kui kartsinoomi markeritena sapiteedes.

#### **1.4. Ekstratsellulaarne maatriks**

Ekstratsellulaarne maatriks (*the extracellular matrix*, EM, ingl. k.) on erinevatest valkudest ja teistest makromolekulidest koosnev võrgustik, mis paikneb rakkude vahel (Ekblom, 1989).

EM võimaldab rakkudel kinnituda ja migreeruda ning sellelt lähtuvad paljud rakkude elutegevust mõjutavad signaalid. Teatud määral reguleerib EM rakkude arengut ning mõjutab nende metabolismi. EM-i komponendid sünteesitakse EM-i läheduses asuvate rakkude poolt. Nende komponentide hulk ja koostis võivad varieeruda, mistõttu on EM väga dünaamiline struktuur (Dziadek ja Timpl, 1985). EM koosneb rakkude poolt sekreteeritud laminiinidest, kollageenidest ja proteoglükaanidest, kuid selle täpne koostis sõltub rakkude tüübist ja arengustaadiumist (Streuli ja Bisell, 1990). Peale selle, et EM hoiab kudesid koos,

reguleerib ta ka erinevate signaaliradade kaudu rakkude käitumist (Hall jt., 1990; Liu jt., 1997).

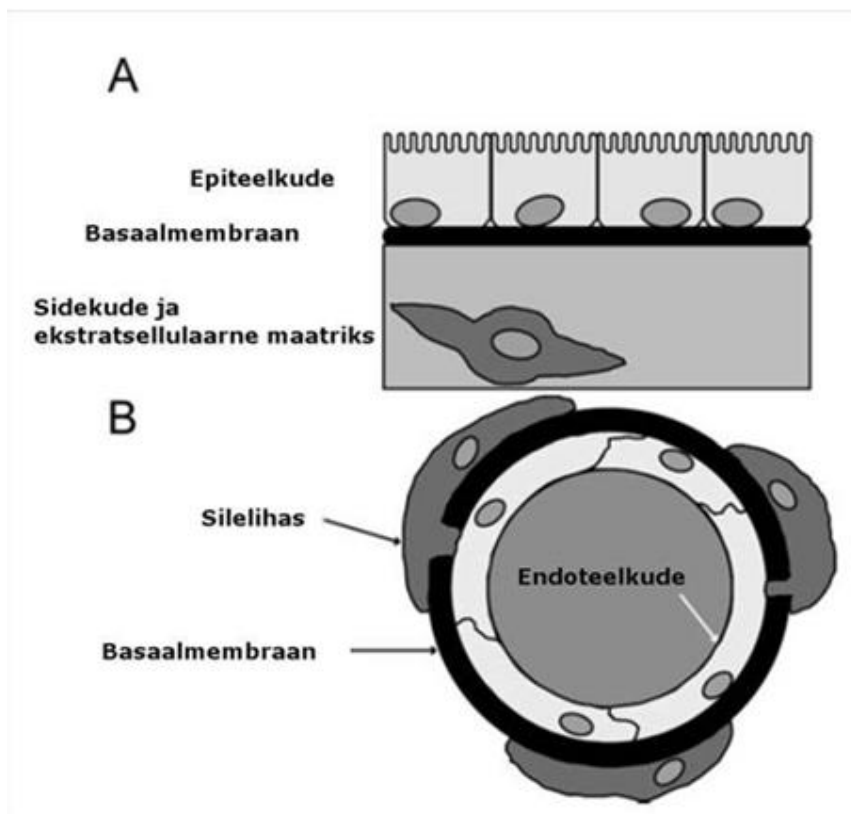
EM-i molekulidele seostuvad ka kasvufaktorid, mille kaudu võib muutuda nende lokaalne aktiivsus. Kasvufaktorid võivad oluliselt mõjutada EM-i koosseisu kuuluvate valkude ja neile seostuvate raku pinnaretseptorite ekspressiooni (Hall jt., 1990; Discher jt., 2009).

Signaalide liikumine EM-ilt rakkudesse toimub plasmamembraanis asuvate transmembraansete retseptorite kaudu, mis seovad EM-i rakusiseste signaali ülekande radadega (Hynes, 2002; Badylak, 2007). Enamikul EM-i molekulidel on mitu integriinse siduvat domääni, mis vahendavad rakkude adhesiooni ja signaalide ülekannet (Geiger jt., 2009) ning on teada ka, et võrgustiku mehaanilised omadused (jäikus, deformeeritavus) mõjutavad rakkude käitumist (Whittaker jt., 2006).

### **1.4.1. Basaalmembraanide ehitus ja funktsioonid**

#### **1.4.1.1. Basaalmembraan**

Basaalmembraan (*basement membrane*, BM, ingl. k.) on 50 kuni 100 nanomeetri paksune EM-i osa, mis paikneb epiteelkudede ja endoteeli basolateraalsel küljel (Lebleu jt., 2007) (joonis 4). BM eraldab raku kihte all asuvast sidekoest, moodustab ehitusliku toe rakkudele ning mõjutab ja muudab rakkude käitumist (Paulsson, 1992).



**Joonis 4. Basaalmembraani lokaliseerumine.** Skeemil näidatud basaalmembraani paiknemine epiteelrakkude monokihi ja selle aluseks oleva sidekoe suhtes (**A**) ning veresoonte basaalmembraani paiknemine endoteelkoe suhtes (**B**) (muudetud, Lebleu jt., 2007).

Spetsiifilised BM-i koostisosad paratamatult mõjutavad BM-vahendatud rakusignalisatsiooni sündmusi ja reguleerivad rakkude käitumist koele iseloomulikul viisil. BM-i neli peamist komponenti on IV tüüpi kollageen, laminiinid, nidogeen/entaktiin ja perlekaan (Erickson ja Couchman, 2000). IV tüüpi kollageen ja laminiinid seostuvad iseseisvalt ning mõlemad komponendid on väga vajalikud BM-i stabiilsuse jaoks (Miner jt., 2004; Hallmann jt., 2005). Nidogeen/entaktiin ja perlekaan ühendavad IV tüüpi kollageeni ja laminiini võrgustikke, suurendavad nende stabiilsust ja mõjutavad BM-i ehituslikku terviklikkust. Vähem oluliste komponentide spetsiifiline koosseis tagab BM-i spetsiifilisuse ja heterogeensuse (Kalluri jt., 1997). BM-is kõige rikkalikumalt esindatud IV tüüpi kollageeni protomeeride ja laminiini alatüüpide koespetsiifiline ekspressioon määratleb tõenäoliselt suurimad erinevused kudedes leiduvate BM-ide koostiste vahel (Poschl jt., 2004).

#### 1.4.1.2. Basaalmembraani funktsioonid

BM-i kooslused on väga erinevad, koespetsiifilised ja dünaamilised. Nende kooslus ja ülesehitus muutub lähtudes koe füsioloogilisest ja patofüsioloogilisest seisundist. Nende heterogeensus tuleneb BM-i komponentide suhtelisest kogusest ja kasutatud alatüüpide omadustest. Näiteks võib neerus leida vähemalt kolme erinevat IV tüüpi kollageeni. Neeru tuubulite epiteel, mis reguleerib vee ja elektrolüütide tasakaalu, omab unikaalset BM-i kooslust, mis on oluliselt erinev glomerulaarse BM-i kooslusest (Paulsson, 1992).

BM-d täidavad mitmeid bioloogilisi funktsioone, mis ulatuvad koe ülesehitusest kuni kasvufaktorite hoidlateks olemiseni. BM pakub ehituslikku tuge ja korrastab koe arengus üherakulisi kihte (Kahsai jt., 1997). BM töötab imetajate neerudes ka poolläbilaskva selektiivse barjäärina, kus IV tüüpi kollageeni võrgustik, laminiini 511/521 polümeer ja perlekaanid tagavad mehaanilise tugevuse ja GBM-i (*glioblastoma multiforme*, ingl. k.) laetuse omadused, mis on vajalikud korralikuks vere filtreerimiseks (Stanley jt., 1982). BM-i valgud omavad mitmeid sidumiskohti rakkude adhesioonimolekulidele ja paljud struktuurid toimivad ligandidena rakkude pinnaretseptoritele. Raku pinnaretseptorite seostumine BM-i valkudele käivitab rakusisesed signaalsatsioonirajad, mis mõjutavad rakkude käitumist. BM-i koostisosad juhivad rakkude diferentseerumist (Tzu ja Marinkovich, 2008) ja inhibeerivad või soodustavad rakkude proliferatsiooni ja migratsiooni (Yurchenco, 2011). BM-i kahjustumisele vigastuse või patogeneesi, näiteks neoplaasia, tõttu järgneb BM-i remodelleerimine. BM-i remodelleerimine tähendab BM-i valkude *de novo* ümberpaiknemist, iseeneslikku liitumist ja BM-i võrgustiku moodustumist. Selle protsessi käigus mõjutavad raku käitumist nii BM-i ülesehituse muutused, aga ka peidetud sidumiskohtade paljastumine. Need muutused soodustavad koe parandamisele suunatud rakulisi tegevusi nagu immuunrakkude kaasamist ja fibroblastide aktiveerimist (Bose jt., 2006).

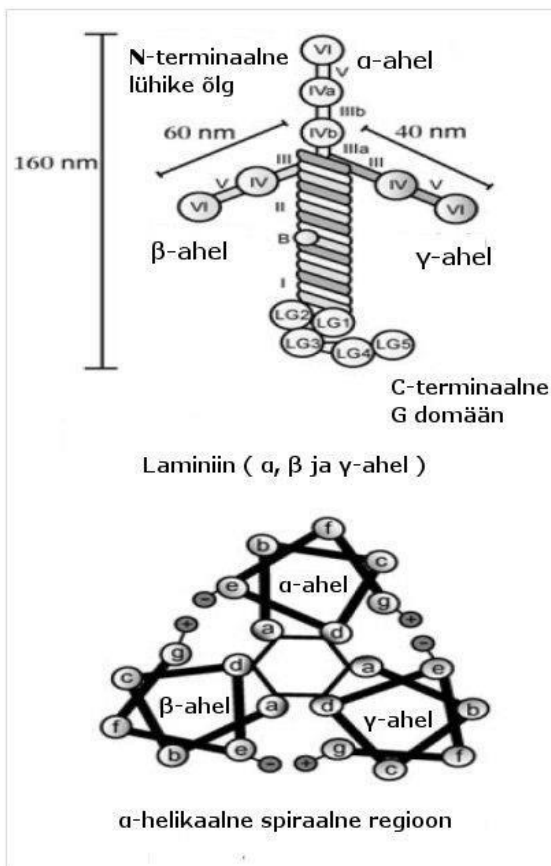
#### 1.4.1.3. Laminiinid

Laminiinid mängivad olulist rolli basaalmembraani moodustumises ja struktuuris seondudes erinevate rakupinna retseptoritega, mis reguleerivad ümbritsevate rakkude elulemust, diferentseerumist, adhesiooni ning migratsiooni (Ferletta, 2002; Yurchenko ja

Batton, 2009). Laminiinid on kõige rikkalikumalt esindatud mittekollageensed valgud BM-s (Tunggal jt., 2000). Üksteist geeni kodeerivad ühteteist laminiini valgu perekonna ahelat ( $\alpha 1-5$ ,  $\beta 1-4$  ja  $\gamma 1-3$ ) (Yurchenco, 2011). Iga ahel on nimetatud kas  $\alpha$ -,  $\beta$ - või  $\gamma$ -ahelaks, lähtudes järjestuse tunnustest ja valgu domeeni ülesehitusest (Patarroyo jt., 2002; Yousif jt., 2013 ).

Laminiinid on heterotrimeersed ahelad, mis moodustavad kolmeharulise kahvli.  $\alpha$ -,  $\beta$ - ja  $\gamma$ -ahelate C-terminaalsed osad moodustavad laminiinkahvli "käepideme". Kolm "haru" on laminiini lühikesed õlad, mis ulatuvad spiraalsest domeenist välja (joonis 5). Ahelad moodustavad 15 trimeerset kombinatsiooni. Laminiini molekuli keskseks ahelaks on teistest subühikutest pikem  $\alpha$ -ahel, mille ümber keerduvad  $\beta$ - ja  $\gamma$ -ahelad. Ahelate C-terminaalne osa moodustab pika õla ning N-terminaalne osa lühikese õla (joonis 5).  $\alpha$ -ahela variantide lühikese õla pikkus varieerub suures ulatuses ning see määrab ahelate erinevad funktsionaalsed omadused. Seetõttu kasutatakse  $\alpha$ -ahelate lühikeste õlgade erinevat ehitust laminiini molekulide klassifitseerimisel (Cognato ja Yurchenco, 2000; Hohenester ja Yurchenco, 2013).

Aastal 2005 võeti vastu uus laminiinide nomenklatuur. Sellele eelnevalt tähistati laminiine numbritega 1 kuni 15 vastavalt nende avastamise järjekorrale. Selline tähistus ei anna aga mingit informatsiooni konkreetsete laminiini isovormide ahelalise koosseisu kohta. Seetõttu soovitatakse praegu laminiine tähistada tähtetega „LM“, millele järgneb numbriline kombinatsioon vastavalt sellele, millistest ahelatest konkreetne laminiin koosneb. Näiteks on varasem „laminiin 10“, mis koosneb ahelatest  $\alpha$ -5,  $\beta$ -1 ja  $\gamma$ -1, asendunud nimega „LM511“ (Aumailley jt., 2005). BM-s leiduvad kõik 15 laminiini. Laminiin 111 on esimene laminiin, mis ilmub hiire arengus E4,5-1 ning see on BM-s kõige enamlevinud laminiin. Laminiini alatüübid on erinevalt esindatud lähtudes koespetsiifilisusest (Horejs jt., 2014).



**Joonis 5. Laminiini trimeerse molekuli ehitus. Ülemine joonis.** Molekulil on tähistatud piirkonnad, kuhu kinnituvad rakupinna retseptorid või teised ekstratsellulaarse maatriksi komponendid. Kõik laminiinid koosnevad ühest  $\alpha$ , ühest  $\beta$  ja ühest  $\gamma$  ahelast, mis on ühendatud helikaalse domääni vahendusel. Igal ahelal on N-terminaalne LN-domään (*laminin N-terminal domain*, ingl. k.) ja L4-domään (*loop 4 domain*, ingl. k.), mille vahel paiknevad EGF-sarnased (*epidermal growth factor receptor*, ingl. k.) (LE)-domäänid (*laminin epidermal domain*, ingl. k.).  $\alpha$ -ahela C-terminaalne osa moodustub viiest tandeemsest globulaarsest moodulist. LG-domäänid (LG1-5) (*cell-adhesive globular domain*, ingl. k.) on lagundatavad proteaaside poolt, enamasti LG3 ja LG4 vahelt. **Alumine joonis.** Laminiini perekonna valkudele on iseloomulikud ridvakujulised ja globulaarsed domäänid ning  $\alpha$ -helikaalne spiraalne (*coiled-coil*, ingl. k.) regioon. Kolme ahela  $\alpha$ -helikaalsete spiraalsete regioonide vahel moodustuvate disulfiidsildade abil ühinevad laminiini ahelad intaktseks trimeeriks (muudetud, Lebleu jt., 2007).

#### 1.4.2. Tüviraku niši olemus

On teooria, et kui sünnijärgsed koed on moodustunud, siis saavad elundisisesed tüvirakud eksisteerida vaid piiratud kaitsvas mikrokeskkonnas ehk tüvirakkude nišis (Watt ja Hogan, 2000), mis säilitab tüvirakkude iseloomulikud omadused ning välistab tegurid, mis põhjustavad diferentseerumist (Wurmser jt., 2004). Missugused molekulaarsed mehhanismid



tagavad niši unikaalsuse pole teada, aga *Drosophila* munasarja niši ja seal sisalduvate sugurakkude tüvirakkude uuringud on aidanud jõuda mõistmiseni kui tähtsad on kõik nišis leiduvad struktuurid. Näiteks toimuvad füüsilised kokkupuuted tüvirakkude ja nende nišis leiduvate mitte-tüvirakkudest naabrite vahel, mis säilitavad seal tüvirakke ning kontrollivad nende proliferatiivset aktiivsust (Xie ja Spradling, 2000). Läbiviidud katsed näitavad, et mitte-tüvirakulised naaberrakud toimivad "molekulaarse liimina", mis seovad tüvirakud oma nišši signaaliradade kaudu, millest on kõige olulisemad Notch ja WNT signaalirajad (Whetton ja Graham, 1999; Boulter jt., 2012).

Tüvirakkude niši säilitamisel osalevad valgud on integriinid, mida ekspresseeritakse tüvirakkudes on kõrgel tasemel ning need retseptorid mängivad olulist rolli rakkude adhesiooni vahendamisel BM-ile. Nišš seega säilitab tüvirakke, luues unikaalse EM ligandide keskkonna integriin-retseptorite jaoks tüvirakkude pinnal (Wurmser jt., 2004). Näiteks vereloome tüvirakud (*haematopoietic stem cell*, HSC, ingl. k.) ekspresseerivad  $\alpha 4\beta 1$  ja  $\alpha 5\beta 1$  integriine, mis seonduvad fibronektiinile edendamaks adhesiooni luuüdi stroomas. On tõestatud, et nende integriinide vastased antikehad blokeerivad vereloomet pikaajalistes luuüdi kultuurides (Yasoshima jt., 2000).  $\beta 1$ - ja  $\beta 3$ -integriine peetakse peamisteks raku pinna valkudeks, millele laminiinide molekulid kinnituvad.  $\alpha 3\beta 1$  ja  $\alpha 6\beta 1$  on peamised laminiini  $\alpha 4$ - ja  $\alpha 5$ -ahelaga seonduvad integriinid, mis ekspresseeruvad nii arenevate kui ka diferentseerunud endoteelirakkude pinnal (Fujiwara jt., 2001). BM-is olev laminiin võib olla seega seotud mitmete signalisatsiooniradade ja faktorite aktiveerijana/inhibeerijana ja sellest lähtuvalt toetada tüvirakkude unikaalsete omaduste säilimist.

Kasvufaktoritel ja signaalmolekulidel on oluline roll maksa tüvirakkude nišis. On näidatud, et interferoon gamma märkimisväärselt mõjutab tüvirakkude aktivatsiooni. Interferoon gamma puudulikkusega hiirtel on osalise hepatektoomia järgselt täheldatud nõrgestatud tüvirakulist vastust, kuigi maksa regeneratsioonitase on suurenenud (Kinoshita jt., 1999; Michalopoulos, 2010). Seevastu interferoon gamma ja tuumornekroosifaktori lisamisel lipopolüsahhariididele (mõlemad kasvufaktorid osalevad maksa kasvus) on täheldatud kultiveeritud maksarakkude proliferatsiooni pidurdumist, kuigi samas on suurenenud tüvirakkude aktivatsioon (Overturf jt., 1997). Transformeeriva kasvufaktor  $\beta$  kohta on samuti andmeid, et see reguleerib erinevalt küpseid maksarakke ja ebaküpseid tüvirakke (Knittel jt., 1996). Transformeeriv kasvufaktor  $\beta$  indutseerib küpsete maksarakkude apoptoosi, kuid ei mõjuta tüvirakke või sapiteede epiteeli (Roskams jt., 2004). Interleukiin-6 näib samuti reguleerivat tüvirakkude aktiveerimist ja proliferatsiooni.

Koliinivaese dieedi järgselt vähenes interleukiin-6 puudulikkusega hiirtel tüvirakkude aktivatsioon (Alison jt., 1996). Integriinide seondumine spetsiifilise ligandiga põhjustab signaali ülekande rakku. Maksa uuringute abil on tuvastanud, et basaalmembraani komponendid, nimelt integriinid, on valdavalt ekspresseeritud inimese sapiteede epiteelil:  $\alpha$ -2,  $\alpha$ -3,  $\alpha$ -5,  $\alpha$ -6 ja  $\alpha$ -9 (ahelatega), mis moodustavad dimeerid koos  $\beta$ -1, laminiini ja IV tüüpi kollageeniga, mis on basaalmembraani peamised koostisosad (Ozaki jt., 1998).

## **2. EKSPERIMENTAALNE OSA**

### **2.1. Uurimistöö eesmärk ja ülesanded**

Käesoleva töö eesmärgiks oli kirjeldada maksa tüvirakkude niši ekstratsellulaarset maatriksit normaalses maksas ning selle muutusi maksa kahjustuse ilmnemisel.

Tulenevalt eesmärgist püstitati järgmised ülesanded:

- 1) Testida maksa tüviraku markerite ekspressioonimustrit normaalses ja kahjustatud maksas.
- 2) Anda hinnang nende omavahelisele kolokalisatsioonile.
- 3) Kirjeldada maksa tüvirakkude niši ekstratsellulaarset maatriksit normaalses maksas ning selle muutusi maksa kahjustuse ilmnemisel.

## **2.2. Materjalid ja metoodika**

### **2.2.1. Hiirte käsitletus**

Kasutati seitsme kuni kaheksa nädala vanuseid isaseid BALB/c hiiri, keda süstiti intraperitoneaalselt päevalilleõlis 1:1 lahustatud CCl<sub>4</sub>-ga (*carbon tetrachloride*, ingl. k., tetraklorometaan), kutsumaks esile ägedat või kroonilist maksakahjustust. Hiiri süstiti vastavalt kehamassile (50 µl päevalilleõli + CCl<sub>4</sub>/30g). Kontrollhiirtele, kes olid samuti BALB/c hiireliini hiired, süstiti ainult päevalilleõli, vastavalt kehamassile. Süstiti 2x nädalas ja koeproovid võeti 72 h (1 süsti järgselt) või 96 h pärast viimast süsti. Vastavaid hiiri iga ajapunkti kohta oli kolm.

### **2.2.2. Külmutatud koeproovid**

Hiired ohverdati tservikaalse dislokatsiooni teel ja eemaldati maks, mida eelnevalt perfuseeriti 1xPBS-iga, et vabaneda erütrotsüütidest. Maksaproovid külmutati 2-metüülbutaani (*2-methylbutane*, ingl. k.) mahutis, mis oli asetatud vedelasse lämmastikku. Järgmisel päeval asetati vastavad maksatükid krüovormi, milles oli eelnevalt lisatud külmutussegu ja seejärel hoiti neid krüovorme mõned sekundid vedelas lämmastikus. Koeproove säilitati -80°C juures.

### **2.2.3. Koelõikude lõikamine**

Edasiseks töötluseks lõigati 5 µm paksused lõigud krüotoomi abil (Leica, Saksamaa) ja asetati alusklaasile (StarFrost, Knittel Glass, Saksamaa) ja lasti kuivada toatemperatuuril 1 tund. Lõike säilitati -20°C juures.

### **2.2.4. Immunovärvimine**

Koelõigud fikseeriti 4% paraformaldehüüdi lahusega 1xPBS-s (*phosphate buffered saline*, ingl. k., naatrium-fosfaatpuhvri lahus) 10 minutit toatemperatuuril. Ka edaspidised protseduurid viidi läbi toatemperatuuril, kui pole osutatud teistmoodi. Seejärel inkubeeriti koelõike 1xPBS-iga pesukambris 2x2 minutit, millesse oli lisatud 0,05% Tween-20 (PBST).

Koe permeabiliseerimiseks inkubeeriti koelõike 0,25% Triton-X-100 lahusega PBS-is 10 minutit, millele järgnes 1xPBST 2x2 minutit. Blokeerimiseks kasutati 4% kitse seerumit 1xPBS-is, millega inkubeeriti koelõike 60 minutit niiskes kambris. Seejärel inkubeeriti koelõike primaarse antikeha lahjendusega blokeerimislahuses 60 minutit.

Järgnes pesu 3x5 minutit pesukambris PBST-ga. Seejärel inkubeeriti lahjendatud sekundaarse antikehaga blokeerimislahuses 30 minutit pimedas niisutuskambris. Kasutati firma Invitrogen Alexa Fluor 488 ja Alexa Fluor 555-ga konjugeeritud sekundaarseid antikehi lahjenduses 1/200. Järgnes 3x5 minutit pesu PBST-ga ja seejärel inkubeeriti koelõike rakutuumade visualiseerimiseks DAPI-ga (Sigma), lahjendatud 1/10000-le 1xPBS-is 3 minutit, pimedas niisutuskambris. Seejärel pesti lõike 5 minutit PBST-ga ja sulundati (Fluorescent mounting Medium, Dako). Värvitud preparaate säilitati 4°C juures kaitstuna valguse eest.

## **2.2.5. Mikroskoopiline analüüs**

Koelõikude immunovärvimise tulemuste vaatlemiseks ja pildistamiseks kasutati mikroskoopi Olympus BX61 kaameraga Olympus DP71 ja konfokaalmikroskoopi Olympus Fluoview FV1000. Piltide järeltöötamiseks kasutati arvutiprogramme Hokawo Version 2.1, Adobe Photoshop CS5 Extended ja GIMP Version 2.

## 2.2.6. Kasutatud antikehad

Antikeha	Kloon/kataloogi nr	Päritolu liik	Päritolu	Lahjendus
Primaarsed antikehad				
Anneksiin-3	79904	jänes, polükloonaalne	Abcam	1/100
CD133	19898	jänes, polükloonaalne	Abcam	1/100
CD166	eBioALC48	rott, polükloonaalne	eBioscience	1/250
CD24	M1/69	rott, polükloonaalne	BD Pharmingen™	1/200
CD34	RAM34	rott, polükloonaalne	BD Pharmingen™	1/200
CD44	IM7.8.1	rott, monokloonaalne	CALTAG Laboratories	1/100
CD49f	GoH3	rott, monokloonaalne	BD Pharmingen™	1/100
CD90	OX7	hiir, monokloonaalne	CALTAG Laboratories	1/100
CD90.2	5a-8	hiir, monokloonaalne	CALTAG Laboratories	1/100
CDP	sc-13024	jänes, polükloonaalne	Santa Cruz Biotechnology	1/200
EpCAM	G8.8	rott, polükloonaalne	BioLegend	1/100
GATA3	sc-268	hiir, polükloonaalne	Santa Cruz Biotechnology	1/200
Ki67	POLYCLONAL	jänes, polükloonaalne	Leica	1/500
Klaudiin-4	ZMD.306	jänes, polükloonaalne	Invitrogen	1/100
LRIG1	ZPH01	kits, monokloonaalne	R&D Systems	1/500
P-kadheriin	PCD-1	rott, polükloonaalne	Invitrogen	1/100
RANK	BUQ03	hiir, monokloonaalne	R&D Systems	1/500
Sox2	S9072	jänes, polükloonaalne	SIGMA	1/500
Sox9	LV1762669	jänes, polükloonaalne	Millipore	1/150
Tsütokeratiin-19	EPNCIR127B	jänes, monokloonaalne	EPITOMICS	1/1000
Tsütokeratiin-19	TROMA-III	rott, monokloonaalne	DSHB	kasutan lahjendamata
Tsütokeratiin-7	RCK105	hiir, monokloonaalne	Abcam	1/100
Versikaan	10618	jänes, polükloonaalne	Millipore	1/1000
β-kateniin	9581	jänes, polükloonaalne	Cell Signaling	1/100
Dekoriin	sc-22753	jänes, polükloonaalne	Santa Cruz Biotechnology	1/100
Perlekaan	sc-25848	jänes, polükloonaalne	Santa Cruz Biotechnology	1/100
TROP-2	GOQ02	kits, monokloonaalne	R&D Systems	1/500
Laminiin α-4	377	jänes, polükloonaalne	Münster University	1/1000
Laminiin α-5	405	jänes, polükloonaalne	Münster University	1/200
Laminiin α-5	4G6A211	rott, monokloonaalne	Münster University	kasutan lahjendamata
Laminiin β-2	ABIN460688	jänes, polükloonaalne	antibodies-online GmbH	1/100
Laminiin β-3	sc-20775	jänes, polükloonaalne	Santa Cruz Biotechnology	1/100
Laminiin γ-1	ABIN460491	jänes, polükloonaalne	antibodies-online GmbH	1/100
Laminiin γ-2	sc-20776	jänes, polükloonaalne	Santa Cruz Biotechnology	1/100
Sekundaarsed antikehad				
Alexa 488 kitse hiirevastane IgG			Invitrogen	1/200
Alexa 488 kitse rotivastane IgG			Invitrogen	1/200
Alexa 488 kitse jänesevastane IgG			Invitrogen	1/200
Alexa 555 kitse hiirevastane IgG			Invitrogen	1/200
Alexa 555 kitse rotivastane IgG			Invitrogen	1/200
Alexa 555 kitse jänesevastane IgG			Invitrogen	1/200

## 2.3. Tulemused

### 2.3.1. Testitud maksa tüviraku markerid

Teostati maksa kasvajatele iseloomulike markerite immuunohistokeemiline uuring ja testiti maksa tüvirakumarkerite ekspressiooni nii terves (*wild-type*, *wt*, ingl. k.) kui kahjustunud maksas. Alljärgnev tabel (tabel 1) annab ülevaate testitud tüviraku markeritest. Plussiga on märgitud antikehad, millel suudeti sedastada spetsiifilise signaali.

**Tabel 1. Tüviraku markerid**

Antikeha	Tulemus
Anneksiin-3	-
CD133	+
CD166	+
CD24	+
CD34	+
CD44	+
CD49f	+
CD90	-
CD90.2	-
CDP	+
EpCAM	+
GATA3	+
Ki67	-
Klaudiin-4	+
LRIG1	-
P-kadheriin	+
RANK	+
Sox2	-
Sox9	+
TROP-2	-
Tsütokeratiin-19	+
Tsütokeratiin-7	+
Versican	-
β-kateniin	+

Tulemuste analüüsil täheldati, et enamik maksa tüviraku markereid nagu EpCAM lokaliseeruvad sapiteedes nii normaalses kui tetraklorometaaniga kahjustunud maksas (joonis 6). Pikemaajalise kahjustuse korral, kus hiiri süstiti kaheksa korda tetraklorometaaniga, oli märgata, et EpCAMi ekspressiooniala laienes. Sarnast ekspressioonimustrit täheldati ka CD49f (joonis 7), CK19 (joonis 8) ja P-kadheriini puhul (joonis 9).

Tüviraku markerite CD34 (joonis 10) ja CD24 (joonis 11) ekspressioon lokaliseerus samuti sapiteedes ja ei täheldatud ekspressioonitaseme muutusi erinevates maksakahjustuse järkudes.

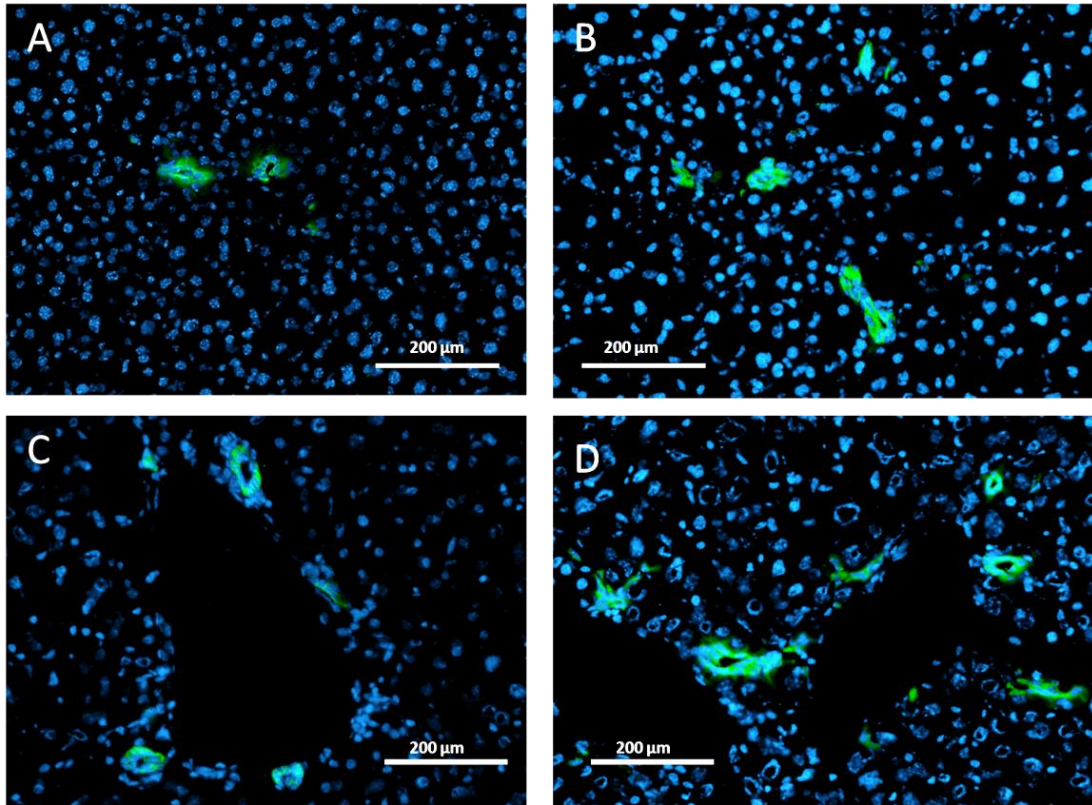
Klaudiin-4 korral (joonis 12) märgati, et normaalses maksas paiknes ta sapiteedes kui ka maksarakkudes ja kahjustunud maksas paiknes Klaudiin-4 sarnaselt. Siiski, pikemaajalise kahjustuse korral oli maksarakkudes paikneva markeri ekspressioon intensiivsem.

CD166 ekspressiooni analüüsil (joonis 13) tähendati erinevusi normaalse ja kahjustunud maksa vahel. Normaalses maksas paiknes CD166 ainult sapiteedes, kuid ägeda maksakahjustuse korral (72 h ja 2 nädalat) lokaliseerus CD166 üle terve maksa nii sinusoididesse kui ka sapiteedesse. Samas pikemaajalisese kahjustuse (4 nädalat) korral lokaliseerus CD166 intensiivsemalt ainult sapijuhadesse, kuid hõredalt üle terve maksa oli näha ka kohatist paiknemist sinusoidides. See väljendab olukorda, kus maksal on pikema aja vältel rohkem võimalusi kohaneda kahjustusega ja üritada väljuda kriitilisest seisundist. Sarnaselt CD166-le paiknes Sox9 värvumine (joonis 14) normaalses maksas vaid sapiteedes, kuid maksa kahjustuse korral esines ka lisaks maksarakkudes.

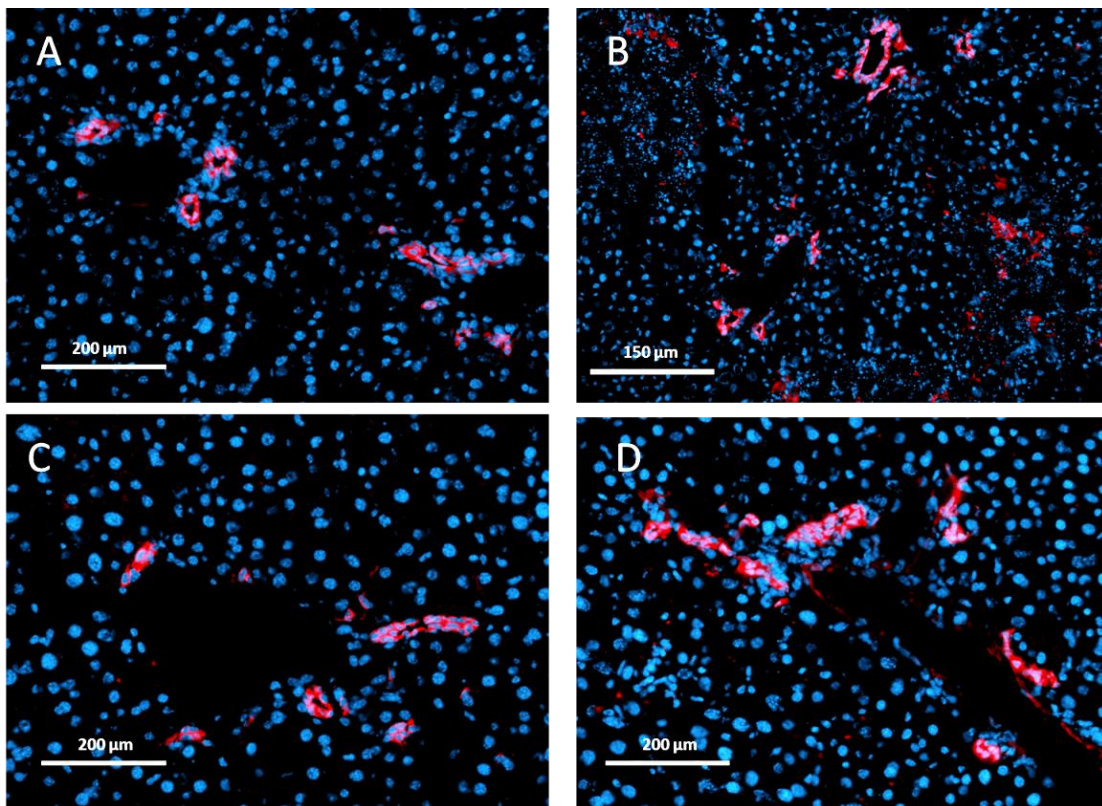
Tüviraku markeri CD133 (joonis 15) ekspressiooni uurides tähendati, et lisaks sapiteede värvumisele nii normaalses kui kahjustunud maksas, värvus lisaks veel sinusoidide ja veresoonte epiteel, natuke tugevamalt kahjustunud maksas kui normaalses. Sarnast ekspressioonimustrit nähti ka marker CD44 korral (joonis 16), kuid selle vahega, et peale sapiteede, märkis see marker ka maksarakke nii normaalses kui kahjustunud maksas; siiski oli kahjustunud maksas CD44 ekspressioon natuke intensiivsema.

Vaadati ka  $\beta$ -kateniini ekspressiooni (joonis 17).  $\beta$ -kateniin akumuleerub tuuma Wnt signaalile, kus ta transkriptsioonifaktoritega seondudes reguleerib geeniekspressiooni. Wnt/ $\beta$ -kateniin rada omab keskset rolli embrüonaalses arengus ning häired selles on seotud ka vähi tekkega (MacDonald jt., 2009; Clevers ja Nusse, 2012). Täheldati, et see paikneb maksa sinusoidides ja sapiteedes nii normaalses maksas kui ka kahjustunud maksas ning pikemaajalise maksa kahjustuse korral olid saadud signaalid tunduvalt tugevamad.



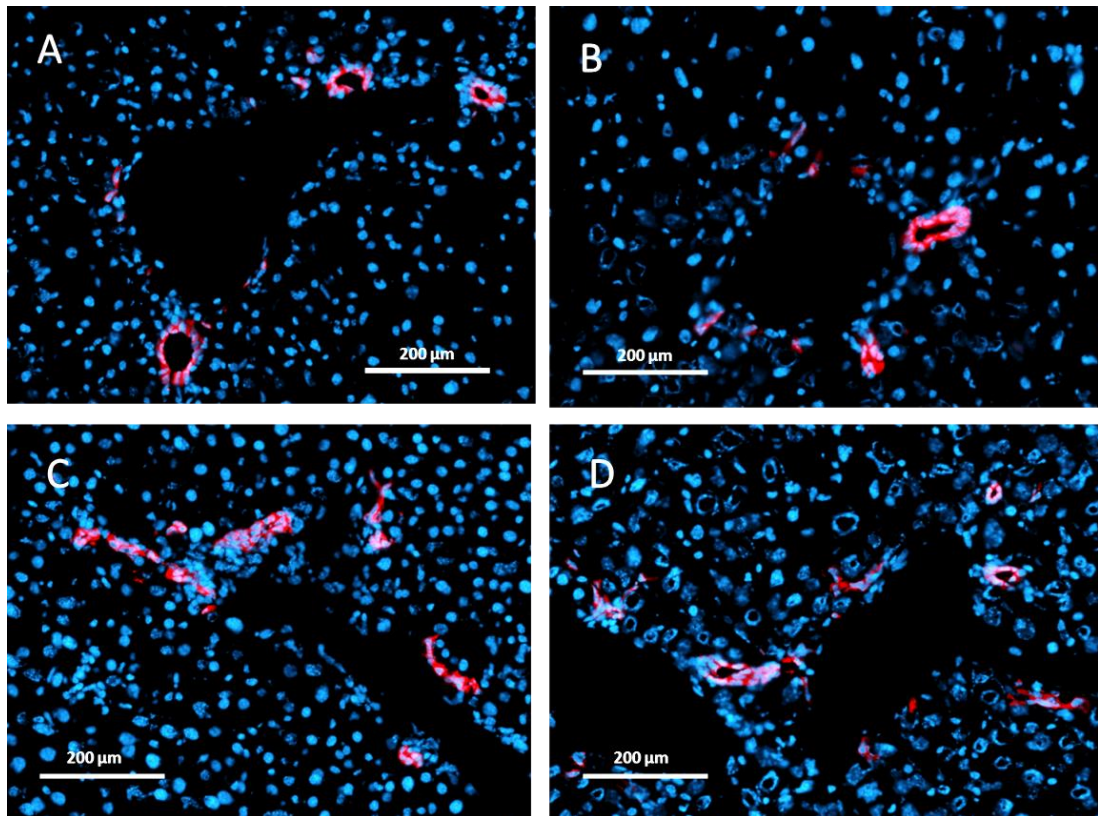


**Joonis 6. EpCAM ekspressioon normaalses maksas ja kahjustunud maksas. A.** Normaalne maks, *wt*, **B.** Kahjustunud maks, 72 h, **C.** Kahjustunud maks, 2 nädalat, **D.** Kahjustunud maks, 4 nädalat. DAPI – sinine, EpCAM – roheline. Suurendus 20x.

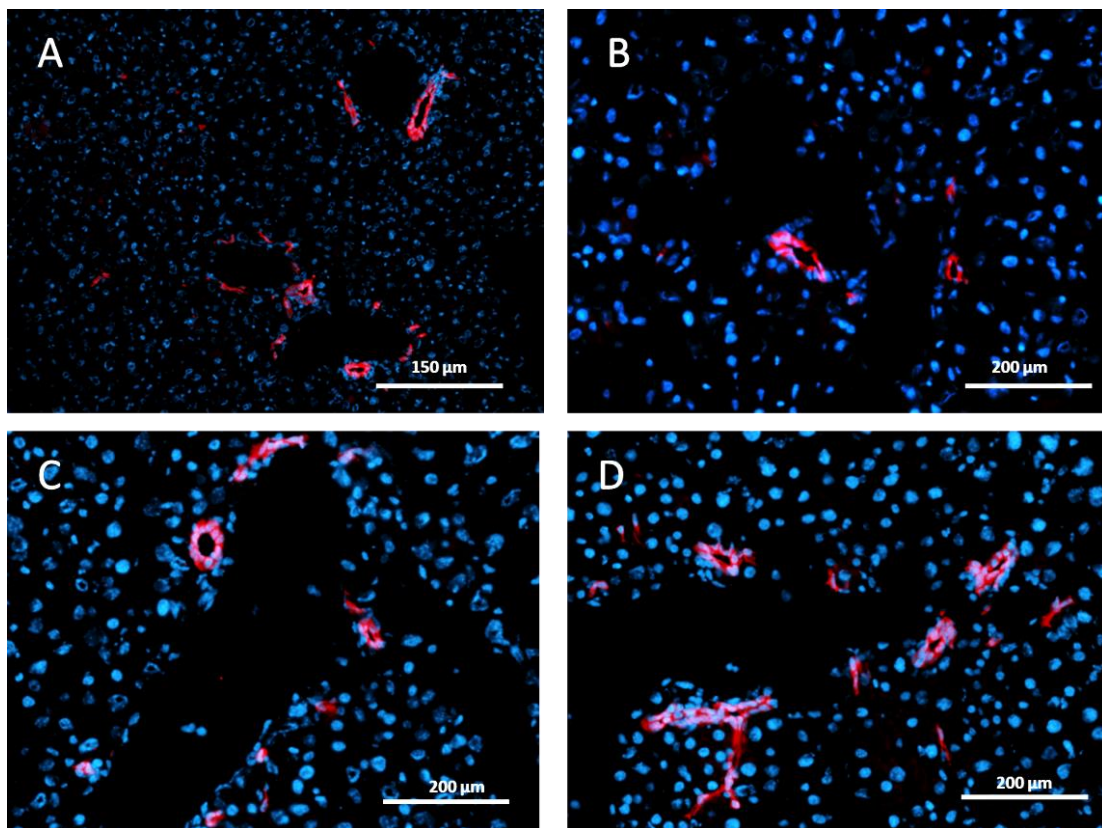


**Joonis 7. CD49f ekspressioon normaalses maksas ja kahjustunud maksas. A.** Normaalne maks, *wt*, **B.** Kahjustunud maks, 72 h, **C.** Kahjustunud maks, 2 nädalat, **D.** Kahjustunud maks, 4 nädalat. DAPI – sinine, CD49f – punane. Suurendus 10x, 20x.



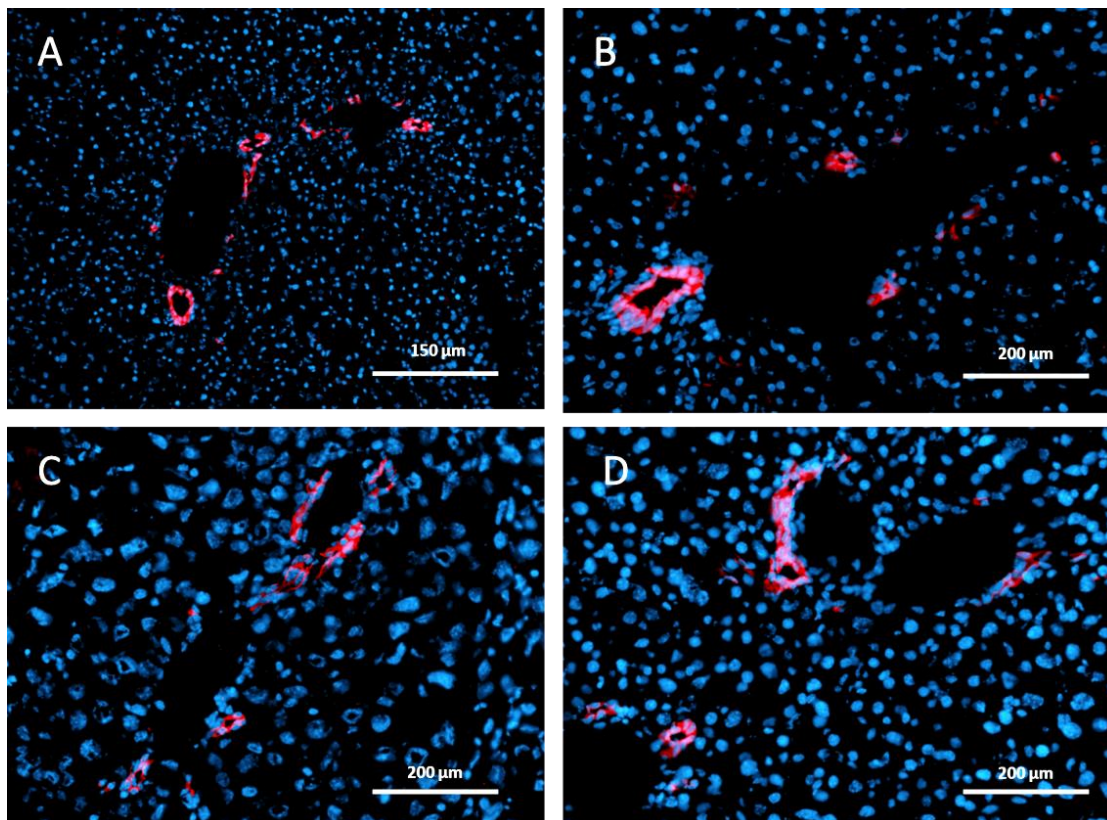


**Joonis 8. Tsütokeratiin-19 ekspressioon normaalses maksas ja kahjustunud maksas. A.** Normaalne maks, *wt*, **B.** Kahjustunud maks, 72 h, **C.** Kahjustunud maks, 2 nädalat, **D.** Kahjustunud maks, 4 nädalat. DAPI – sinine, CK19 – punane. Suurendus 20x.

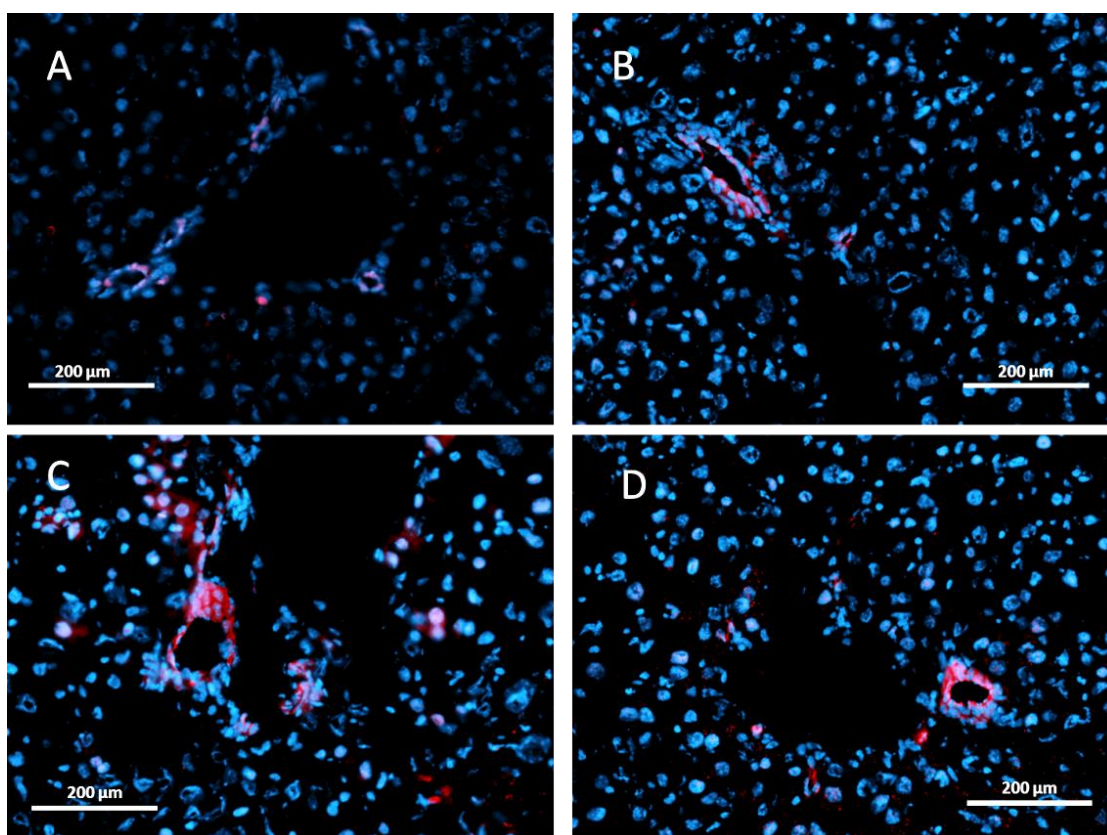


**Joonis 9. P-kadheriin ekspressioon normaalses maksas ja kahjustunud maksas. A.** Normaalne maks, *wt*, **B.** Kahjustunud maks, 72 h, **C.** Kahjustunud maks, 2 nädalat, **D.** Kahjustunud maks, 4 nädalat. DAPI – sinine, P-kadheriin – punane. Suurendus 10x, 20x.



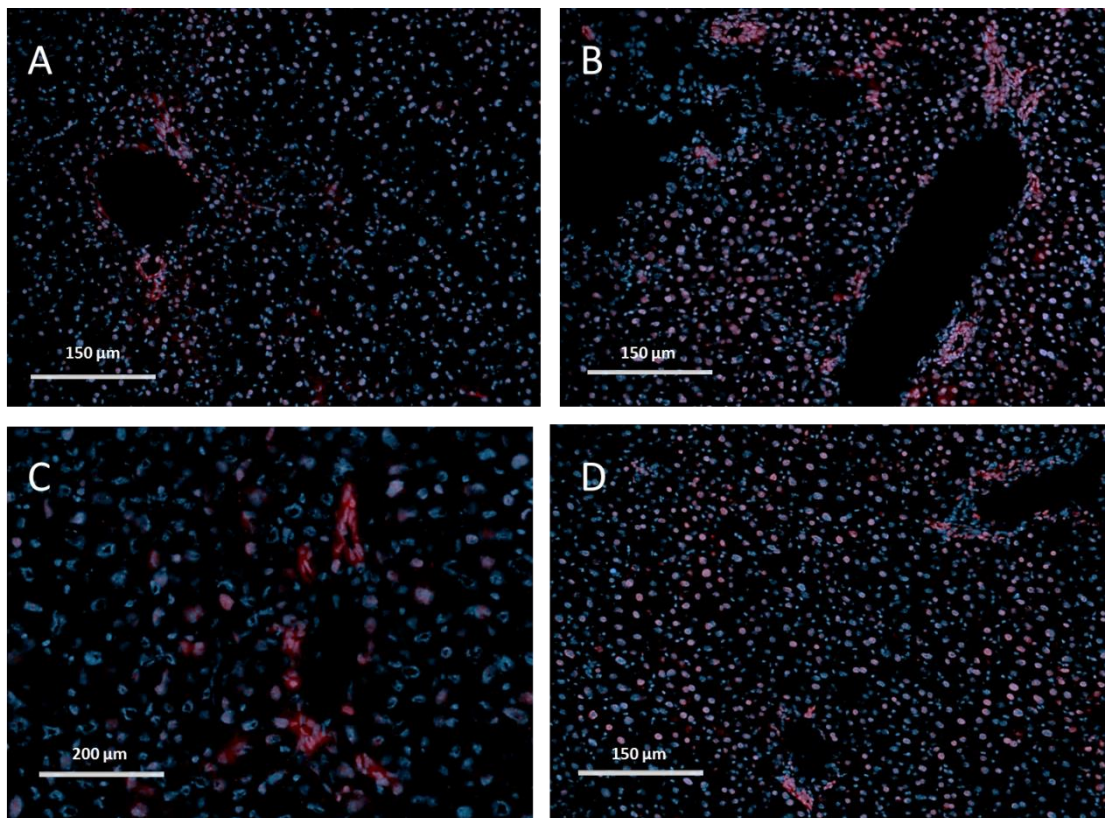


**Joonis 10. CD34 ekspressioon normaalses maksas ja kahjustunud maksas. A.** Normaalne maks, *wt*, **B.** Kahjustunud maks, 72 h, **C.** Kahjustunud maks, 2 nädalat, **D.** Kahjustunud maks, 4 nädalat. DAPI – sinine, CD34 – punane. Suurendus 10x, 20x.

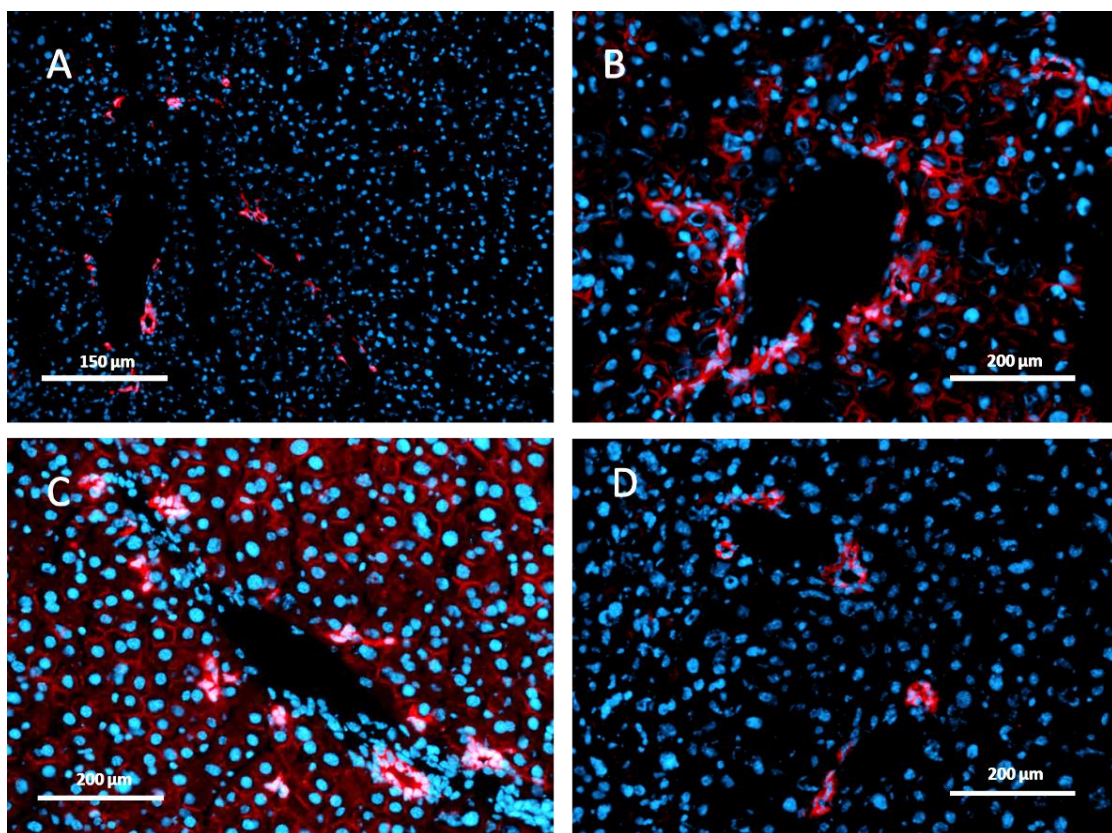


**Joonis 11. CD24 ekspressioon normaalses maksas ja kahjustunud maksas. A.** Normaalne maks, *wt*, **B.** Kahjustunud maks, 72 h, **C.** Kahjustunud maks, 2 nädalat, **D.** Kahjustunud maks, 4 nädalat. DAPI – sinine, CD24 – punane. Suurendus 20x.



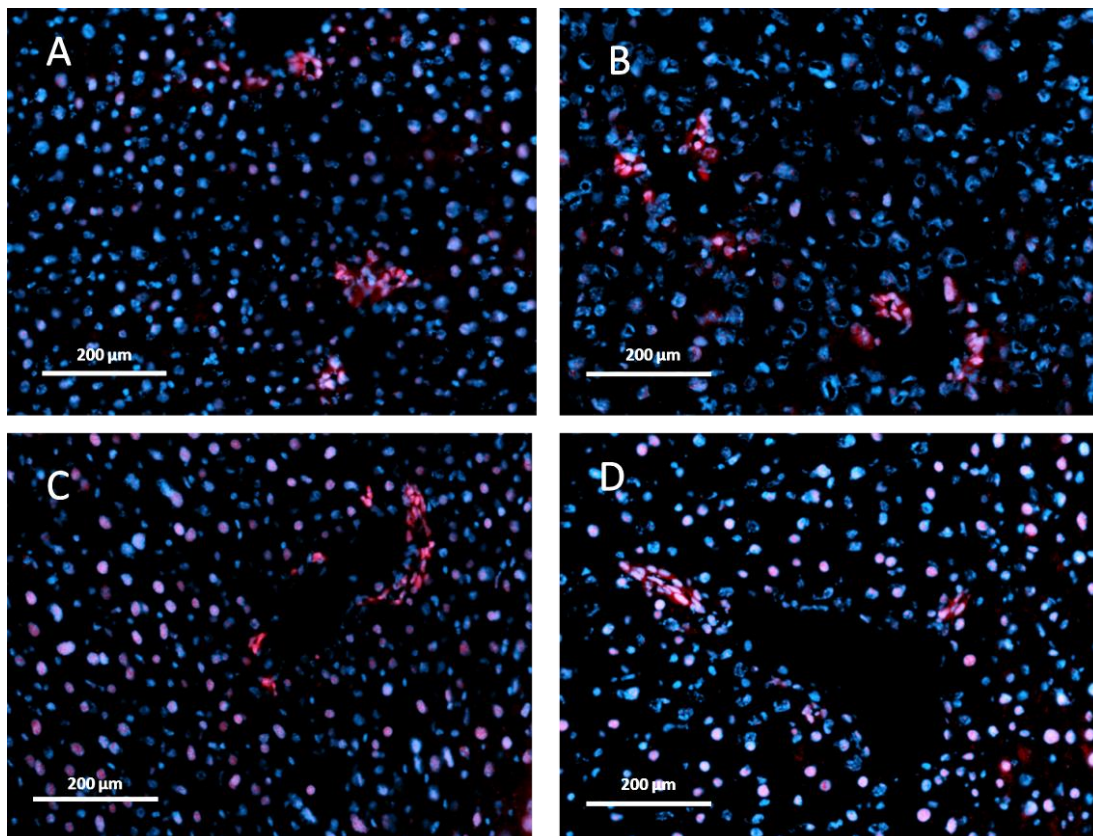


**Joonis 12. Klaudiin-4 ekspressioon normaalses maksas ja kahjustunud maksas. A.** Normaalne maks – *wt*, **B.** Kahjustunud maks, 72 h, **C.** Kahjustunud maks, 2 nädalat, **D.** Kahjustunud maks, 4 nädalat. DAPI – sinine, Klaudiin-4 – punane. Suurendus 10x, 20x.

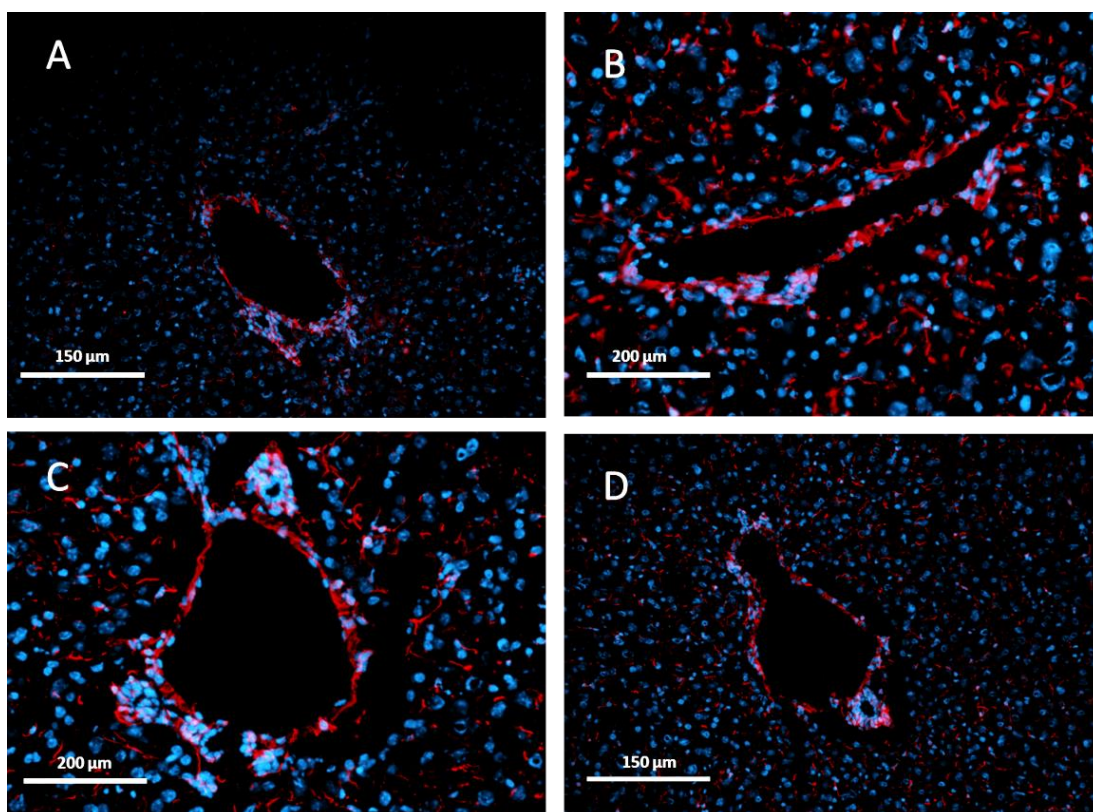


**Joonis 13. CD166 ekspressioon normaalses maksas ja kahjustunud maksas. A.** Normaalne maks, *wt*, **B.** Kahjustunud maks, 72 h, **C.** Kahjustunud maks, 2 nädalat, **D.** Kahjustunud maks, 4 nädalat. DAPI – sinine, CD166 – punane. Suurendus 10x, 20x.



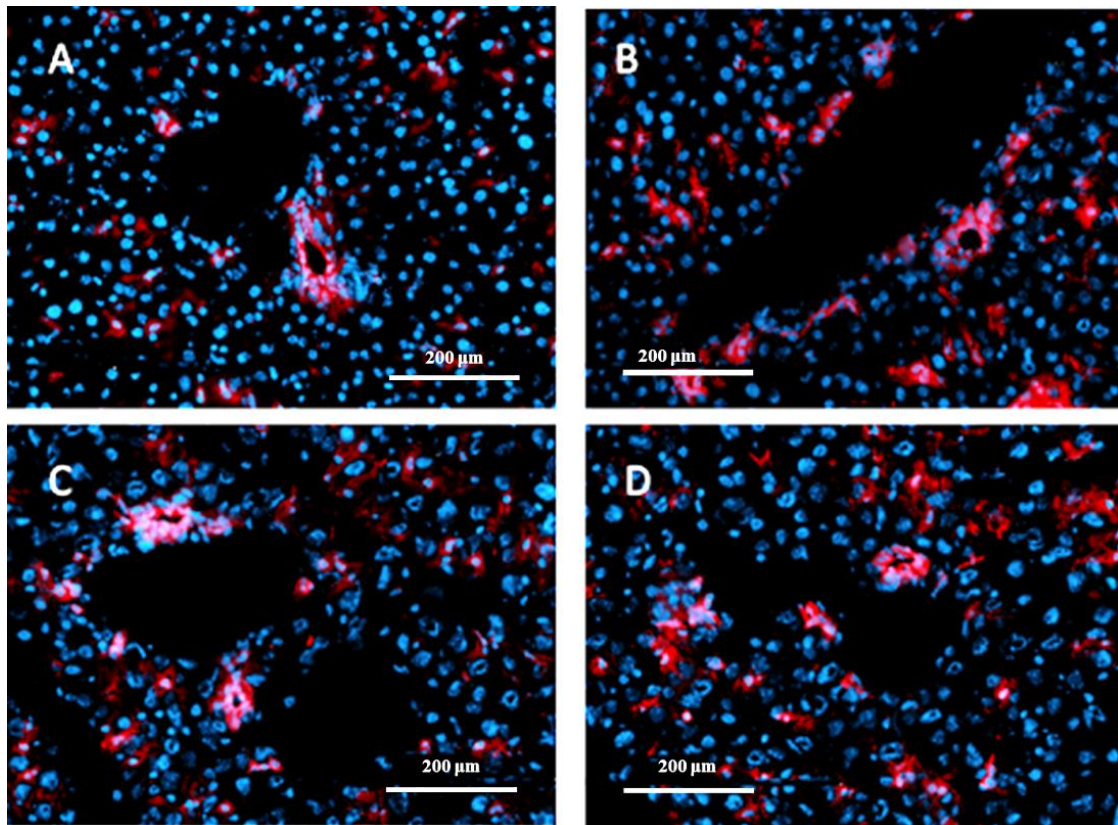


**Joonis 14. Sox9 ekspressioon normaalses maksas ja kahjustunud maksas. A.** Normaalne maks – *wt*, **B.** Kahjustunud maks, 72 h, **C.** Kahjustunud maks, 2 nädalat, **D.** Kahjustunud maks, 4 nädalat. DAPI – sinine, Sox9 – punane. Suurendus 20x.

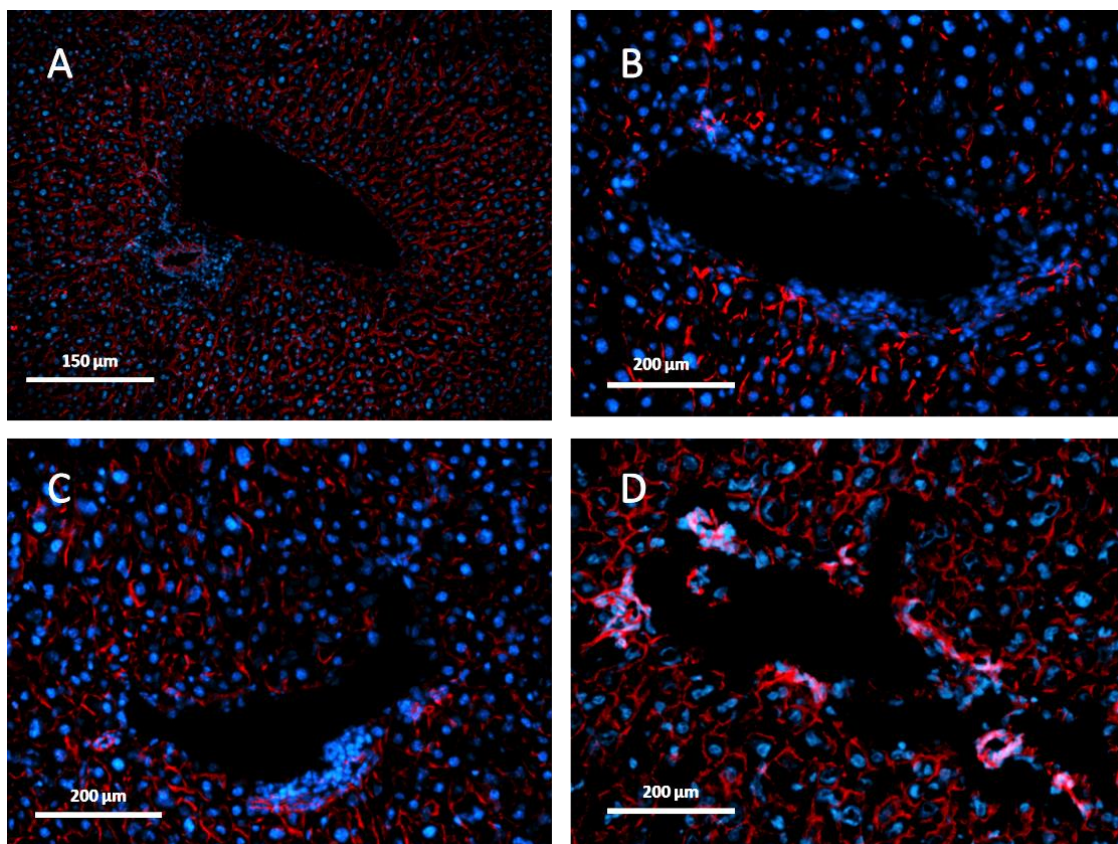


**Joonis 15. CD133 ekspressioon normaalses maksas ja kahjustunud maksas. A.** Normaalne maks, *wt*, **B.** Kahjustunud maks, 72 h, **C.** Kahjustunud maks, 2 nädalat, **D.** Kahjustunud maks, 4 nädalat. DAPI – sinine, CD133 – punane. Suurendus 10x, 20x.





**Joonis 16. CD44 ekspressioon normaalses maksas ja kahjustunud maksas. A.** Normaalne maks, *wt*, **B.** Kahjustunud maks, 72 h, **C.** Kahjustunud maks, 2 nädalat, **D.** Kahjustunud maks, 4 nädalat. DAPI – sinine, CD44 – punane. Suurendus 20x.



**Joonis 17.  $\beta$ -kateniin ekspressioon normaalses maksas ja kahjustunud maksas. A.** Normaalne maks, *wt*, **B.** Kahjustunud maks, 72 h, **C.** Kahjustunud maks, 2 nädalat, **D.** Kahjustunud maks, 4 nädalat. DAPI – sinine,  $\beta$ -kateniin – punane. Suurendus 10x, 20x.

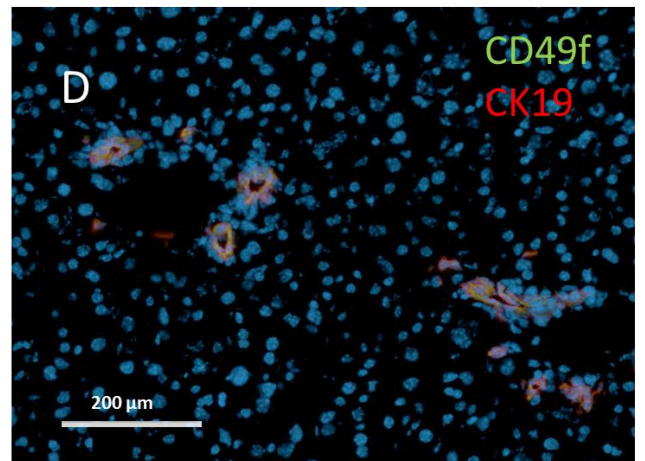
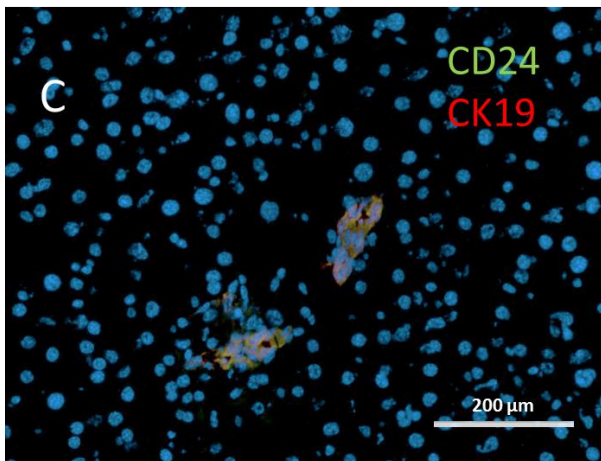
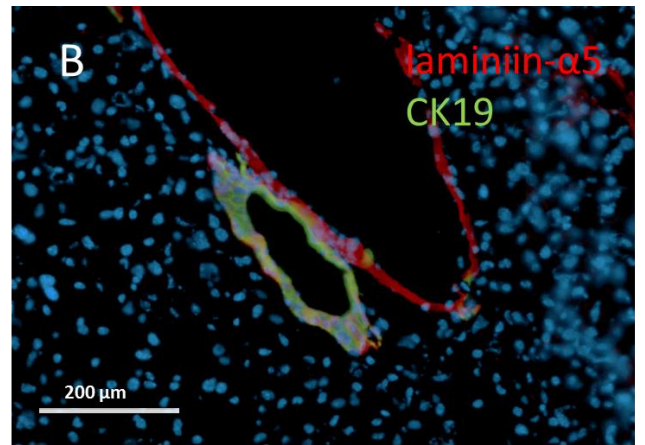
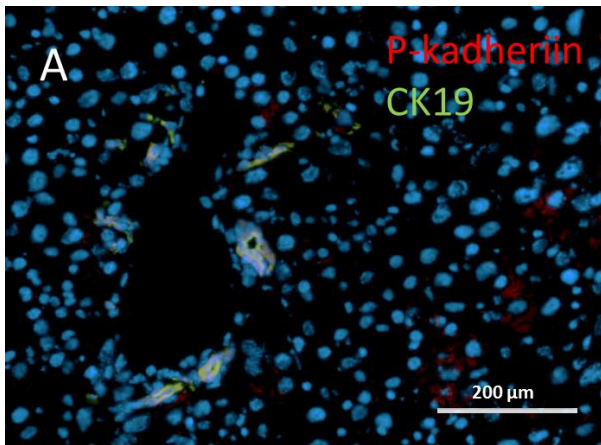
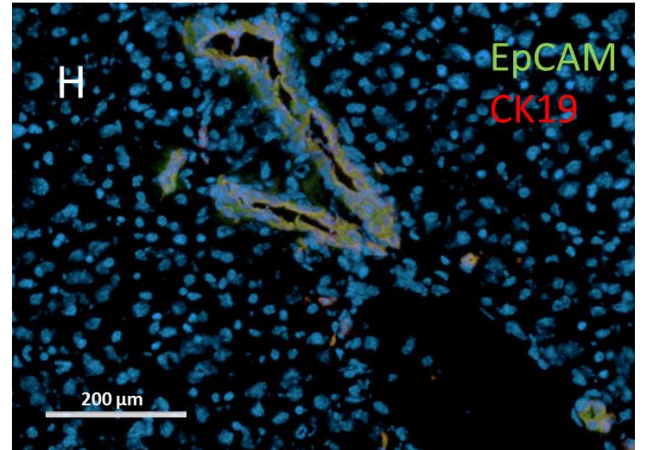
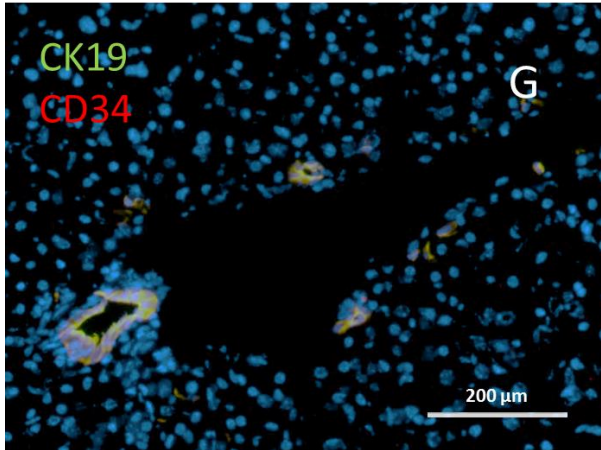
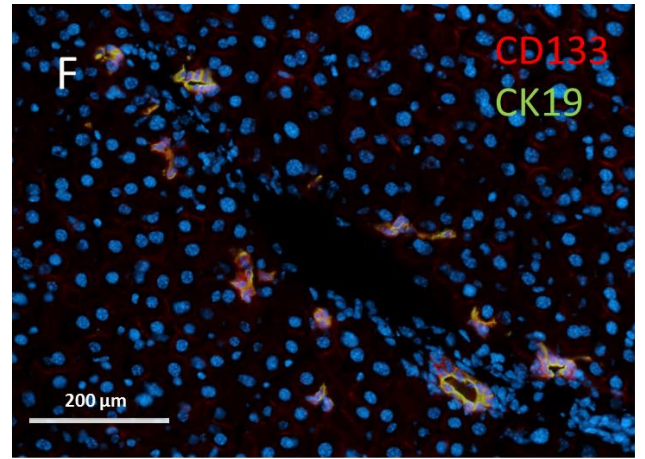
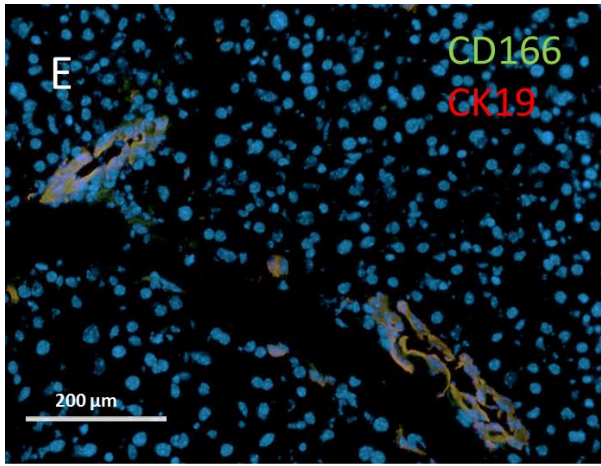
### **2.3.2. Maksa tüviraku markerite kolokalisatsiooni hindamine CK19-ne suhtes**

Selleks, et hinnata erinevate maksa tüviraku markerite täpset lokalisatsiooni biliaarse süsteemi rakkude suhtes, kasutati epiteliaalset tsütokeratiini-19 markerit. Tsütokeratiinid moodustavad intermediaarset tüüpi filamentidest tsütoskeleti enamikes epiteelirakkudes. Seega on CK-19 abil võimalik erinevaid epiteelkudesid ja nende kasvajaid määrata (Moll jt., 1982). Esmalt näidati, et CK19 asub nii normaalses kui kahjustunud maksas sapiteedes (joonis 8).

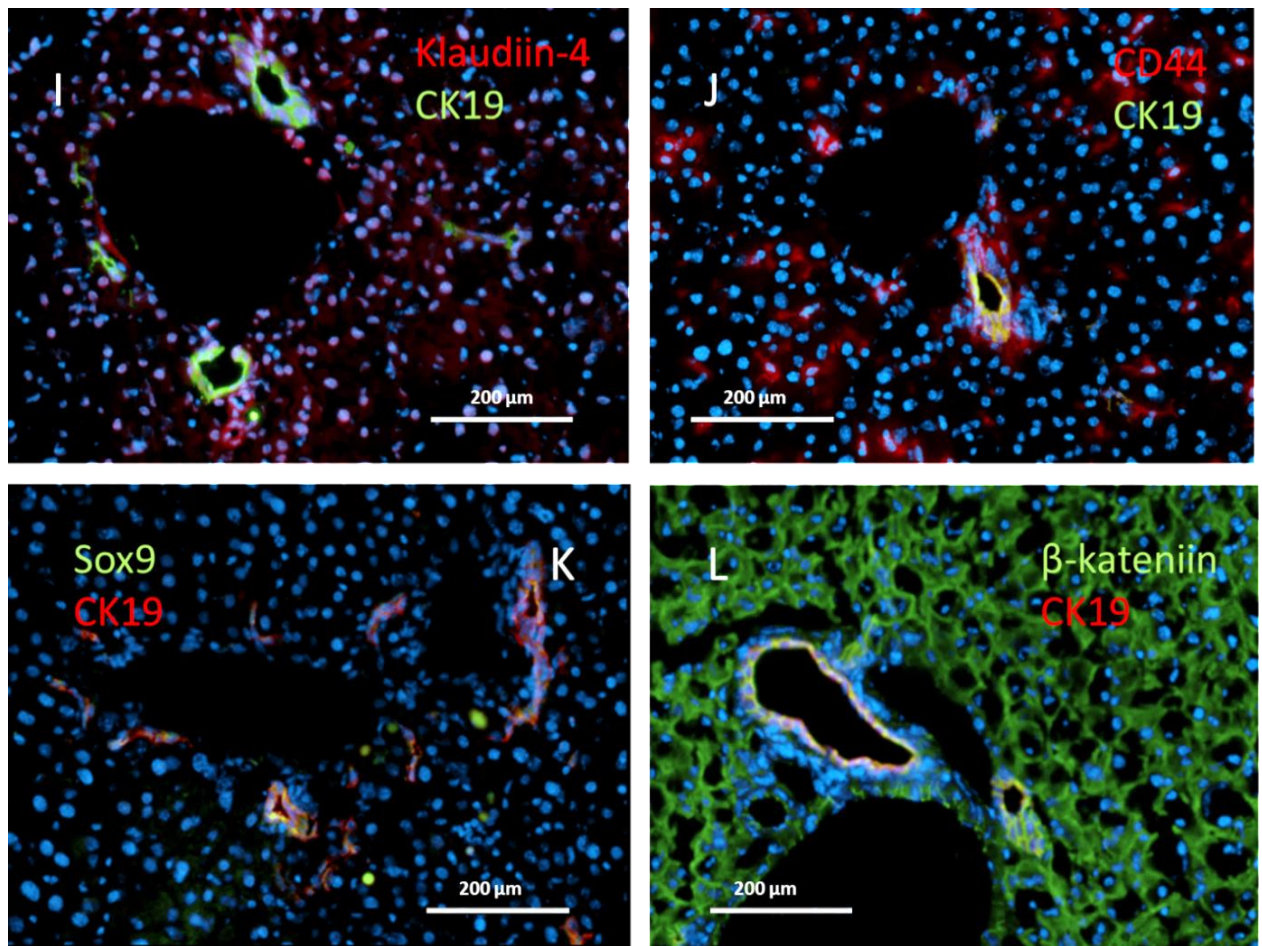
Seejärel vaadati kolokalisatsiooni CK19-ga normaalses maksas, maksa kõigi tüviraku markeritega. Samasugust kolokalisatsiooni täheldati ka kahjustunud maksas (andmed esitamata). Sellega kinnitati asjaolu, et maksa tüvirakud asuvad sapiteede epiteelis (joonis 18).

Veel nähti, et mõned tüviraku markerid nagu CD166 ja Sox9 normaalses maksas kolokaliseerusid CK19-ga, kuid kahjustunud maksas oli ka näha tugevat signaali parenhüümirakkudes, mis näidatab selgepiirilist erinevust nende markerite ekspressioonis normaalses ja kahjustunud maksas (joonis 19).

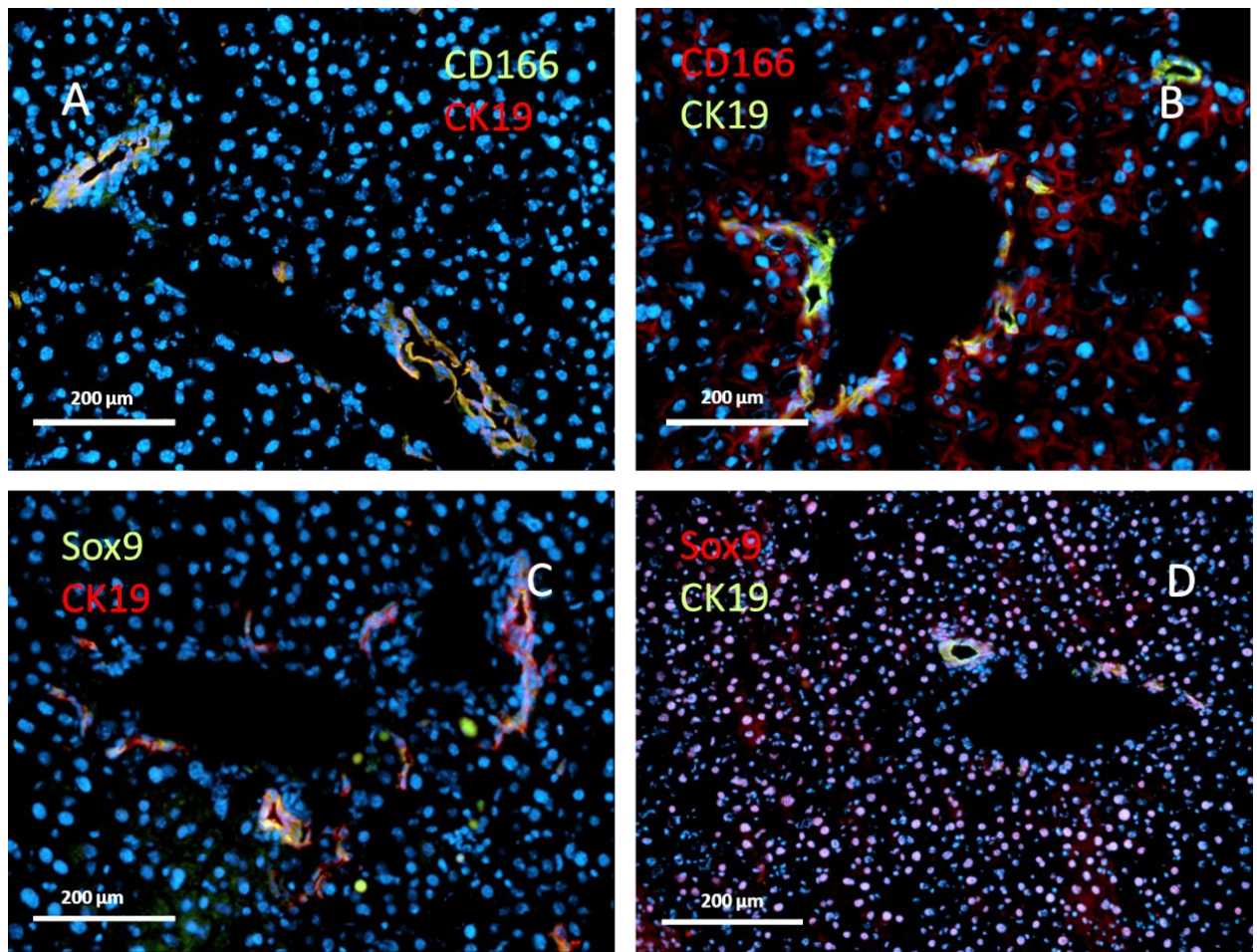








**Joonis 18. Tüviraku markerite kolokaliseerumine tsütokeratiin-19-ga normaalses maksas.** **A.** Normaalne maks, *wt*; P-kadheriin ja CK19, **B.** Normaalne maks, *wt*; laminiin  $\alpha$ -5 ja CK19, **C.** Normaalne maks, *wt*; CD24 ja CK19, **D.** Normaalne maks, *wt*; CD49f ja CK19, **E.** Normaalne maks, *wt*; CD166 ja CK19, **F.** Normaalne maks, *wt*; CD133 ja CK19, **G.** Normaalne maks, *wt*; CD34 ja CK19, **H.** Normaalne maks, *wt*; EpCAM ja CK19, **I.** Normaalne maks, *wt*; Klaudiin-4 ja CK19, **J.** Normaalne maks, *wt*; CD44 ja CK19, **K.** Normaalne maks, *wt*; Sox9 ja CK19, **L.** Normaalne maks, *wt*;  $\beta$ -kateniin ja CK19. DAPI – sinine. Tüviraku markerite värvid on tähistatud joonistel. Suurendus 20x.



**Joonis 19.** CD166 ja Sox9 võrdlus tsütokeratiin 19-ga nii normaalses maksas kui kahjustunud maksas. **A.** Normaalne maks, *wt*; CD166 ja CK19, **B.** Kahjustunud maks, CCl<sub>4</sub>; CD166 ja CK 19, **C.** Normaalne maks, *wt*; Sox9 ja CK19, **D.** Kahjustunud maks, CCl<sub>4</sub>; Sox9 ja CK19. DAPI – sinine. Suurendus 20x.

### 2.3.3. Laminiinide ekspressioonimuster tüviraku nišis

Laminiine peetakse bioloogiliselt aktiivseimateks basaalmembraani komponentideks, sest nende molekulide seondumisel rakupinna retseptoritele saavad rakud väliskeskkonnast eluks vajalikke signaale. Sellest lähtuvalt otsustati vaadelda erinevaid laminiine. Järgnevas tabelis (tabel 2) on toodud välja testitud EM-i komponendid.

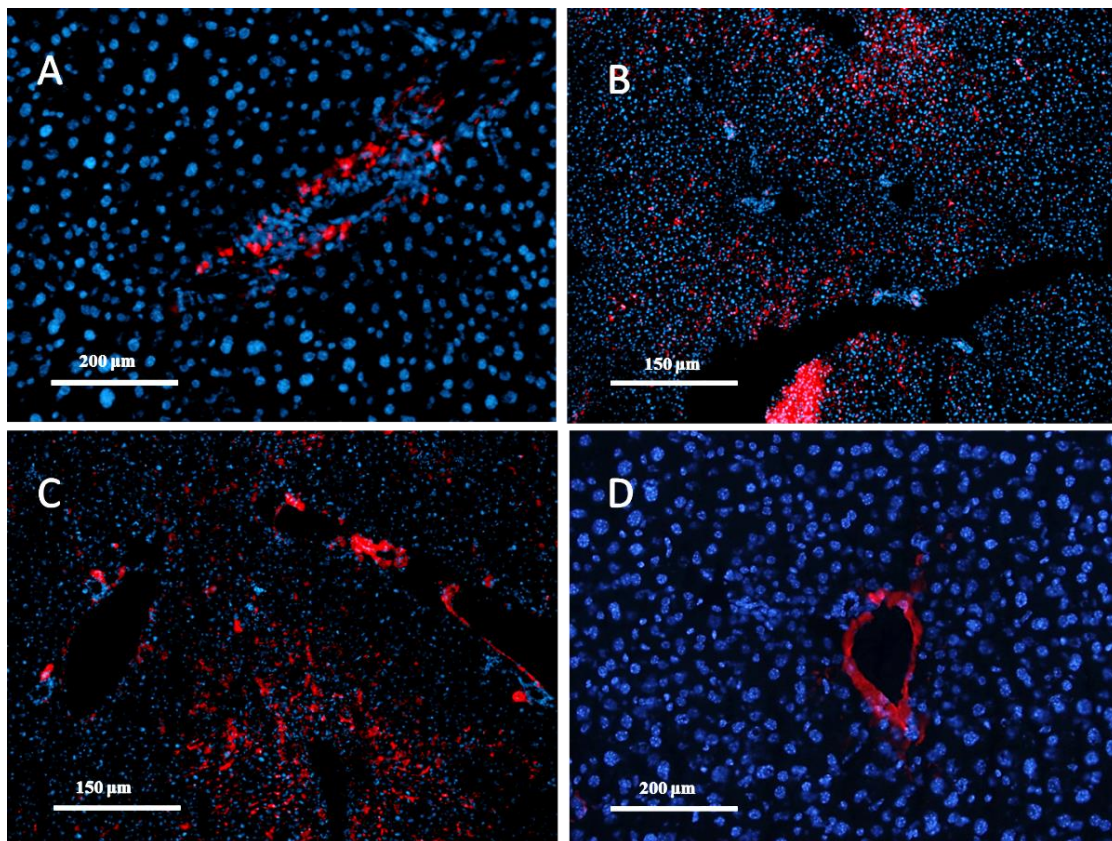
**Tabel 2. Testitud basaalmembraani valgud**

Antikeha	Tulemus
Dekoriin	+
Laminiin $\alpha$ -4	+
Laminiin $\alpha$ -5	+
Laminiin $\beta$ -2	+
Laminiin $\beta$ -3	-
Laminiin $\gamma$ -1	-
Laminiin $\gamma$ -2	+
Perlekaan	-

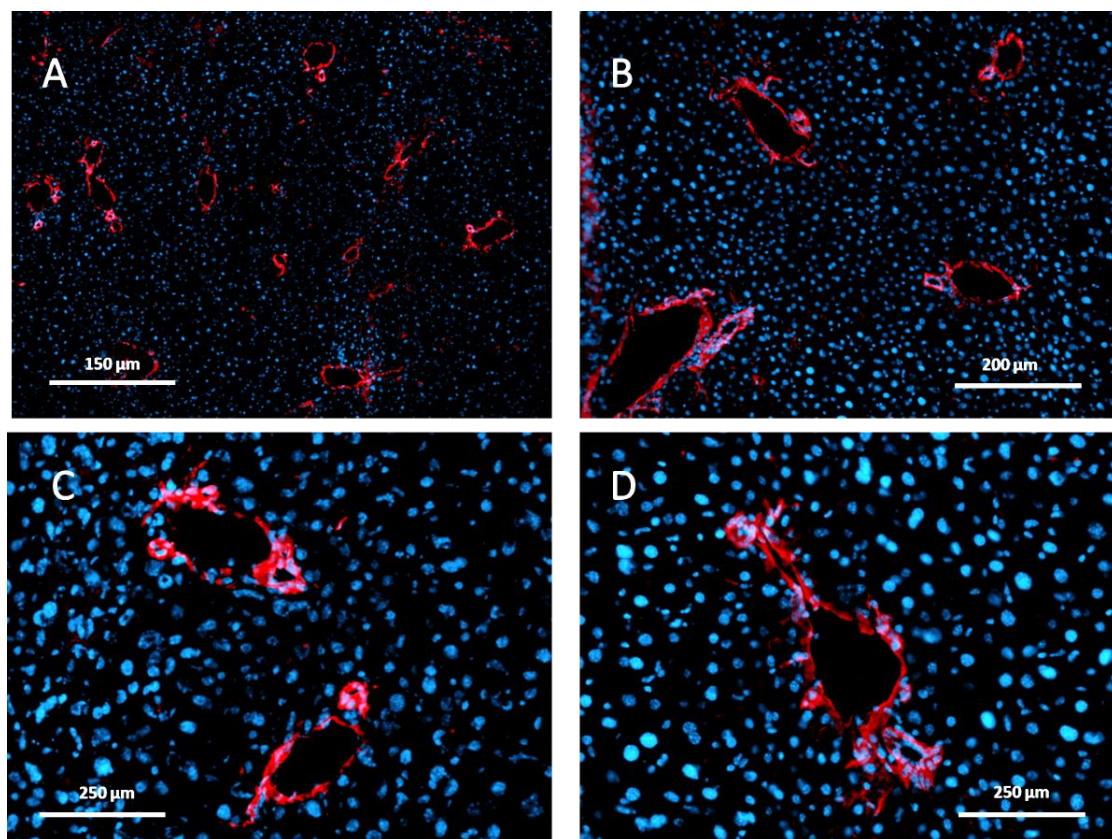
Laminiinide värvumine on esitatud joonisel (joonis 20), eraldi toodi välja laminiin  $\alpha$ -5 lokalisatsioon (joonis 21). Saadud tulemustest tekitas suuremat huvi LM 511  $\alpha$ -5 ahel, mida ekspresseeriti nii veresoontes kui ka sapijuhades. Seevastu LM 411  $\alpha$ -4 ahelalt, ekspresseeriti normaalses maksas ainult veresoontes (joonis 20D), laminiin  $\beta$ -2 lokaliseerus lisaks sapijuhadele ka sinusoidides ja laminiin  $\gamma$ -2 ainult sinusoidides (joonis 20C ja 20B).

Edasi vaadati, kas laminiin  $\alpha$ -5 ahel võib omada rolli tüvrakkude niši kujunemisel. Selleks hinnati laminiin  $\alpha$ -5 kolokalisatsiooni CK19-ga (joonis 22) ja kõige paremini kirjeldatud maksa tüviraku markeri EpCAM-iga (joonis 23). Nähti, et laminiin  $\alpha$ -5 kolokaliseerub täielikult maksa tüviraku markereid ekspresseerivate rakkudega, olenemata maksa kahjustuse tasemest.



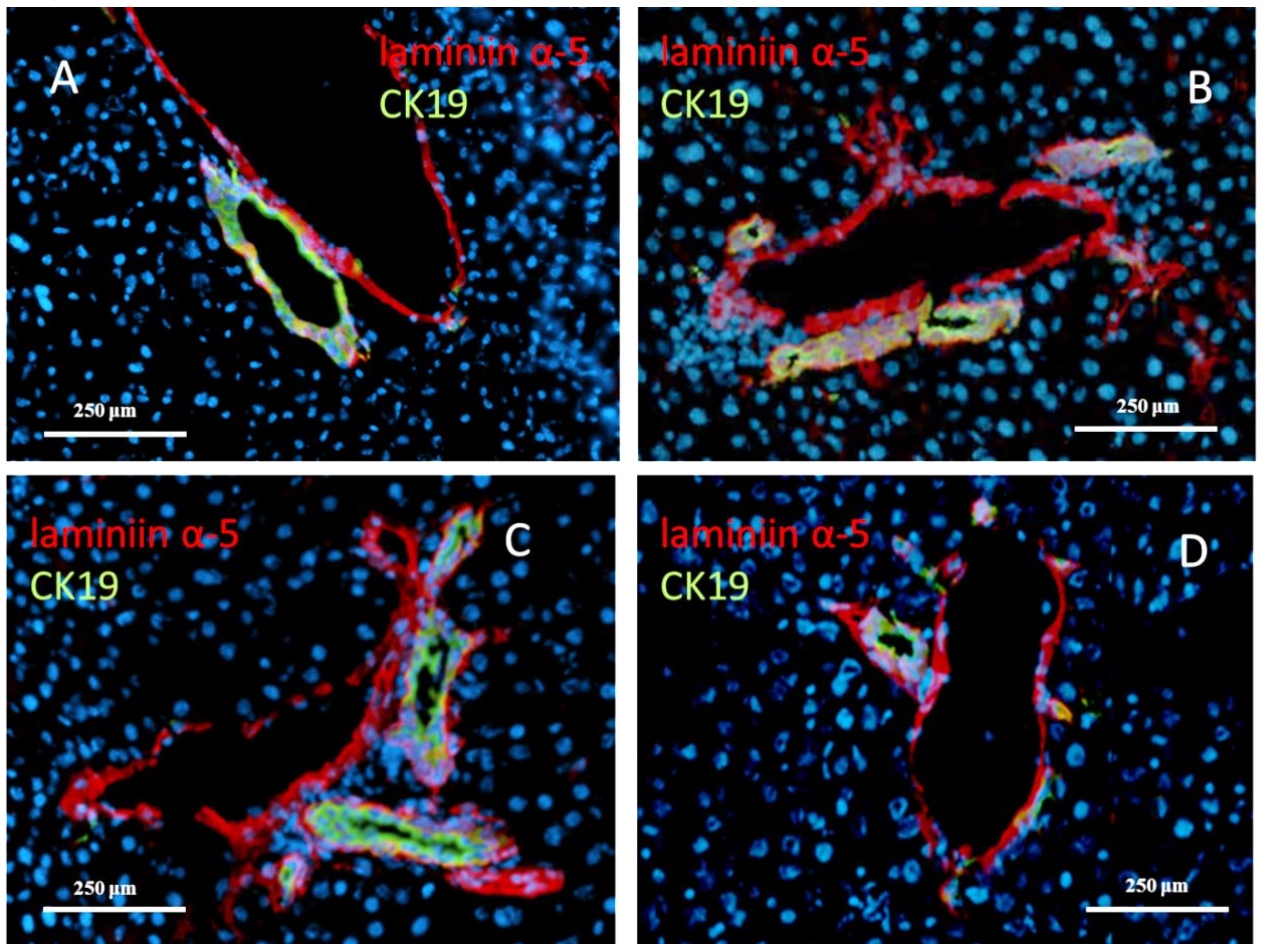


**Joonis 20. Dekoriini ja laminiinide ekspressioon normaalses maksas. A. Dekoriin, B. Laminiin  $\gamma$ -2, C. Laminiin  $\beta$ -2, D. Laminiin  $\alpha$ -4. DAPI – sinine. Vastavad laminiinid – punane. Suurendus 10x, 20x.**

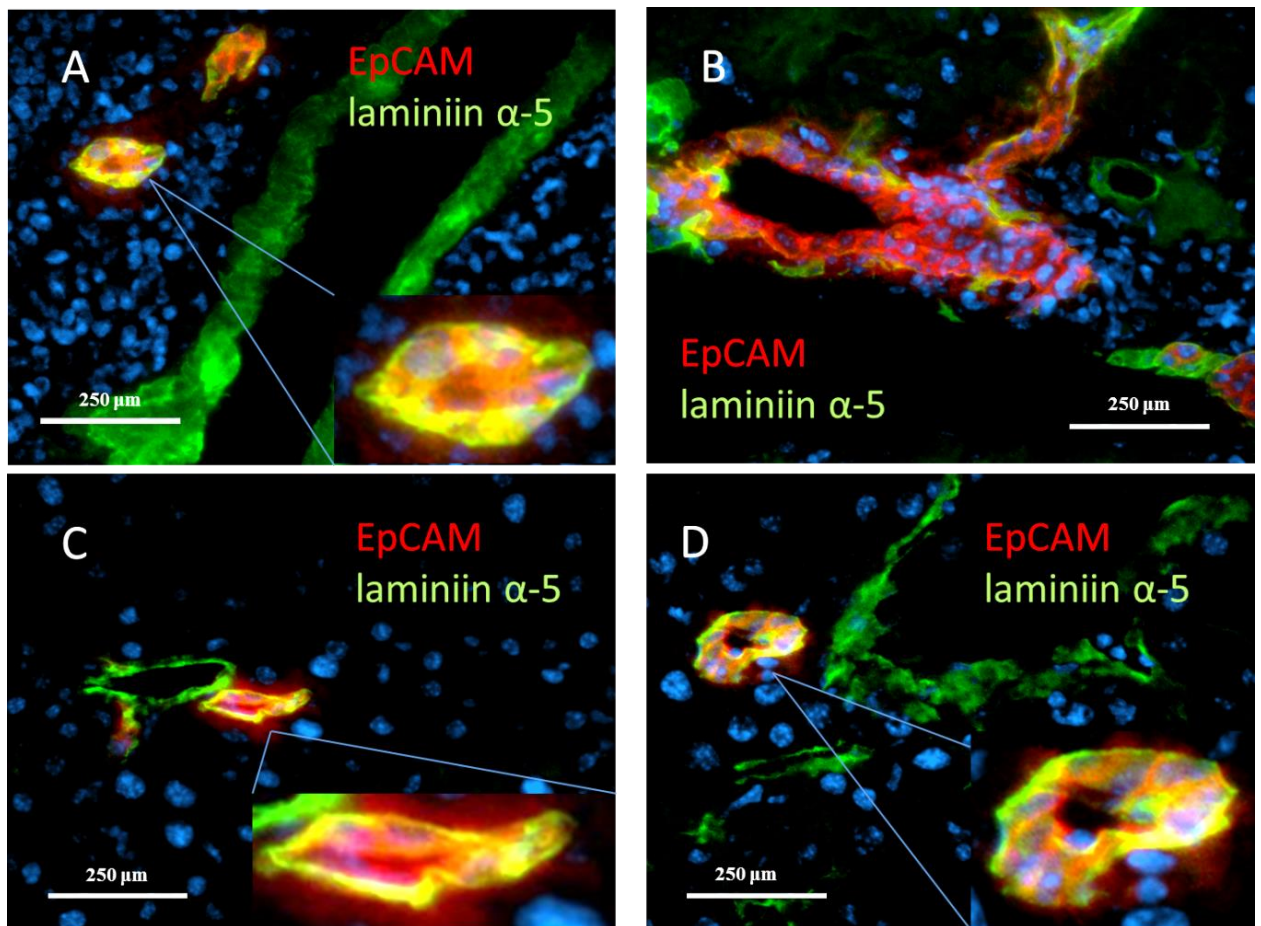


**Joonis 21. Laminiin  $\alpha$ -5 ekspressioon normaalses maksas. A. 10x suurendus, B. 20x suurendus, C. ja D. 40x suurendus. DAPI – sinine, laminiin  $\alpha$ -5 – punane.**





**Joonis 22. Laminiin  $\alpha$ -5 kolokalisatsioon tsütokeratiin-19-ga normaalses ja kahjustunud maksas.** **A.** Normaalne maks, *wt*; laminiin  $\alpha$ -5 ja CK19, **B.** Kahjustunud maks, 72 h; laminiin  $\alpha$ -5 ja CK19, **C.** Kahjustunud maks, 2 nädalat; laminiin  $\alpha$ -5 ja CK19, **D.** Kahjustunud maks, 4 nädalat; laminiin  $\alpha$ -5 ja CK19. DAPI – sinine, laminiin  $\alpha$ -5 – punane, CK19 – roheline. 40x suurendus.



**Joonis 23. Lamiiniin  $\alpha$ -5 kolokalisatsioon EpCAM-iga normaalses ja kahjustunud maksas.**  
**A.** Normaalne maks, *wt*; lamiiniin  $\alpha$ -5 ja EpCAM, **B.** Kahjustunud maks, 72 h; lamiiniin  $\alpha$ -5 ja EpCAM, **C.** Kahjustunud maks, 2 nädalat; lamiiniin  $\alpha$ -5 ja EpCAM, **D.** Kahjustunud maks, 4 nädalat; lamiiniin  $\alpha$ -5 ja EpCAM. DAPI – sinine, lamiiniin  $\alpha$ -5 – roheline, EpCAM – punane. 40x suurendus.

## ARUTELU

Käesolevas töös iseloomustati maksa tüviraku markerite ekspressiooni terves ja kahjustunud maksas. Tüvirakkude nišid asuvad arvatavasti väikestes sapijuhakestes - Heringi kanalites, kus maksa parenhüüm läheb üle sapiteede epiteeliks (Roskams jt., 2004). Ka käesoleva töö tulemused näitasid, et maksa tüvirakkude asukohaks on sapiteed, sest testitud maksa tüvirakkude markerite ekspressioonimustrid lokaliseerusid eranditult sapiteede epiteelis. Siiski kroonilise maksa kahjustuse puhul täheldati ka tüvirakkude populatsiooni laienemist, mille käigus sapiepiteeli markereid kandvad rakud levisid maksa parenhüümi. Näiteks CD166 ja Sox9 ekspressioon laienes ägedalt kahjustunud maksas kolangiotsüüditidelt maksarakkudele (joonised 13 ja 14). Ka CD133 ja CD44 ekspresseeriti nii kolangiotsüütidel kui ka vähesel määral normaalsetes parenhüümirakkudes (joonised 15 ja 16). Seega võib eeldada, et need markerid omandavad rakkudes ka ehk muid funktsioone peale tüvirakkudele iseloomulike ülesannete. Alternatiivne seletus on, et kahjustuse korral omandavad maksarakud teatud tüvirakkudele sarnaseid omadusi, mis seletab ka maksarakkude tähelepanuväärset regeneratsioonivõimet. On täheldatud, et mitteparenhüümirakud (*non-parenchymal liver cells*, NPLC, ingl. k.) ekspresseerivad CD44 püsivalt. Lisaks suureneb kahjustatud maksas CD44 ekspressioon kõikidel olulisematel mitte-parenhüümirakkudel, sealhulgas maksa tähtrakkudel, maksa sinusoidide endoteelirakkudel, Kupfferi rakkudel ja sapiepiteelirakkudel (Kikuchi jt., 2005). Maksa CD44 ekspressiooni kõrget taset on täheldatud sapiteede haigustega patsientidel, sealhulgas esmase skleroseeriva kolangiidi ja ka näiteks kolangiokartsinoomi korral (Cruickshank jt., 1999). CD133 ekspressiooni täheldati krooniliselt kahjustatud maksa ja normaalse maksa korral sapijuhades ja sinusoidides.

Immunofluorestsents analüüsil leiti, et kroonilise maksakahjustuse korral mõnede tüviraku markerite nagu EpCAM, CD49f, CK19 ja P-kadheriini ekspressiooniala isegi lainenes (joonised 6, 7, 8 ja 9), kuid näiteks CD34, CD24 ja Klaudiin-4 ei muutnud ekspressiooni ulatust, olenemata, mis kahjustuse astmega tegemist oli. Klaudiin-4 resideerus ka maksarakkude epiteelis nii normaalses kui kahjustunud maksas, samas CD34 ja CD24 leidis ainult sapijuhades (joonised 10, 11 ja 12). Üks võimalik seletus, kuna CD34 ja CD24 on adhesioonimolekulid, seega võib olla pole nende ekspressioon seotud tüvirakkude jagunemisega, vaid nad täidavad oma spetsiifilisi funktsioone ainult sapiteedes.

Vaadeldi ka  $\beta$ -kateniini ekspressioonimustrit. On näidatud, et  $\beta$ -kateniini signaalirada omab rolli tüvirakkude taastootmisel ja säilitamisel (Logan ja Nusse, 2004).  $\beta$ -kateniini on

multifunktsionaalne adaptervalk, mille funktsioon on kõige paremini kirjeldatud Wnt signaalirajas, mis on oluline maksa regeneratsioonis ning maksakasvajate tekkel (Thompson jt., 2007; MacDonald jt., 2009; Nejak-Bowen ja Monga, 2011). Märgati, et  $\beta$ -kateniin lokaliseerub üle terve maksa sinusoidides ja kõrgemal tasemel sapijuhades (joonis 17).

Et määrata täpsemalt rakupopulatsioone, mis ekspresseerivad maksa tüviraku markereid, määrati nende ekspressioonimuster CK19 suhtes. Sapiteid voorderavad epiteelrakud ekspresseerivad CK19 ja CK7 (Moll jt., 1992). Leiti, et kõik vaadeldud maksa tüviraku markerid ekspresseeruvad sapiteedes, kuna nende markerite ja CK19 ekspressioonimuster kattub täielikult normaalses maksas (joonis 22). Klaudiin-4, CD44, CD133, CD166 ja Sox9 paiknesid ka lisaks veel teistes parenhüümirakkudes.

Tüvirakkude käitumise ning saatusel regulatsioon nišis sõltub nende suhetest naaberrakkude ja ekstratsellulaarse maatriksiga. Tüvirakkude niši kirjeldati esmakordselt luuüdi puhul ning see on soolekrüptis selgesti eristatav (Schofield, 1978; Petersen jt., 1999). Enamik uuringuid haakuvad üksteisega selles osas, et tüvirakkude nišid asuvad sapiteedes. EM-i ülesehitus tüvirakkude nišis on ilmselt samuti üks tüvirakkude käitumise võtmedeterminante. Vereloome tüvirakke ümbritseb nii katseloomades kui inimese loote maksakoes laminiini-rikas basaalmembraan. Laminiin toetab vereloome tüvirakkude proliferatsiooni *in vitro*, kuigi selle funktsionaalse rolli kohta *in vivo* puudub igasugune tõendusmaterjal (Lorenzini jt., 2010). Laminiini sünteesivad tõenäoliselt maksa müofibroblastid (Duffield jt., 2005).

Testides EM-i komponente, nähti, et laminiinid  $\gamma$ -2,  $\beta$ -2, ja dekoriin (joonis 20) olid ekspresseeritud normaalses maksas madalal tasemel. Laminiin  $\alpha$ -4 signaali täheldati normaalses maksas ainult portaalveenis ja maksaarteris, kuid kahjustunud maksas täheldati nõrka signaali ka sapijuhades (andmed esitamata). Normaalses maksas laminiin  $\beta$ -2 lokaliseerus lisaks sapijuhadele ka sinusoidides ja laminiin  $\gamma$ -2 ainult sinusoidides. Perlecani, laminiin  $\beta$ -3 ja laminiin  $\gamma$ -1 puhul ei suudetud mingit signaali detekteerida. Seevastu laminiin  $\alpha$ -5 ekspresseerus kõrgel tasemel sapijuhades ning veresoontes. Sellest lähtuvalt jätkati laminiin  $\alpha$ -5 määramisega. Näidati, et laminiin  $\alpha$ -5 (joonised 22 ja 23) kolokaliseerub maksa tüviraku markereid ekspresseerivate rakkudega olenemata maksa kahjustuse tasemest, mis annab alust arvata, et sapiteede basaalmembraanis resideeruv laminiin  $\alpha$ -5 omab olulist rolli tüviraku niši reguleerimisel. Seda oletust toetavad ka uuringud, mis näitasid, et LM511 toetab embrüonaalsete tüvirakkude ja naha keratinotsüütide kasvu *in vitro* ja nende tüvirakuomaduste säilimist (Li jt., 2004; Rodin jt., 2010).



Mõistmine, mil määral EM-i koostise muutumine võib reguleerida organi regenereerimisvõimet on oluline küsimus. On välja pakutud mitmeid sekkumisvõimalusi, et parandada fibroseerumist ja takistada organpuudulikkuse arengut. Kui näiteks osutuks võimalikuks mikrokeskkonda muutes taastada maksatsirroosi korral parenhüümirakkude funktsioon, siis võib olla võimalik taastada maksafunktsioone maksa struktuuriliste kõrvalekallete parandamisega. Samuti võib kasulikuks osutada tsirrootilisest maksast pärit üksikute rakkude kui seni puutumata siirderakkude allika kasutamine patsientidel, kellel esinevad maksa ainevahetushäired, kuid kelle maksa mikrokeskkond on kahjustamata.

Oluline on veel märkida, et käesolevas töös kirjeldatud uuringud viidi läbi närilistel. Analoogete uuringuid, mis kirjeldaksid maksa tüvirakkude markered ja neid ümbritseva EM-i muutusi maksakahjustuse või tsirroosi korral, tuleks läbi viia inimese maksa koeproovidel, et kinnitada samade protsesside toimumist ka inimese maksas.

Kroonilise kahjustusega maksa taastamiseks vajalike protseduuride arendamine on hädavajalik. Maksa taastamisprotsesside arengu kiirendamiseks peavad ravistrateegiad keskenduma lisaks tüvirakkude aktiveerimisele ka rakuväliste võrgustike ümberkujundamisele.

## KOKKUVÕTE

Maksasiirdamine on ainuke võimalus ravida lõppstaadiumis maksahaigusi, mille hulka kuuluvad nii maksavähk kui ka maksatsirroos. Maksa parenhümatoomide rakkude suur ja ainulaadne proliferatsioonivõime muudab maksa ideaalseks organiks, et uurida rakkude regeneratsiooni omandatud kroonilise haiguse puhul. Sellest lähtuvalt oli uurimistöö ülesandeks kirjeldada maksa tüviraku markerite ekspressiooni ning tüvirakkude nišši nii normaalses kui kahjustunud maksas.

Käesoleva töö tulemusena näidati, et peamised maksa tüvirakkude markerid nagu EpCAM, CD49f, CK19, P-kadheriin, CD34 ja CD24 lokaliseeruvad peamiselt maksa sapiteedes, kuid mõned maksa tüviraku markerid nagu CD133, CD44 ja Klaudiin-4 ning kahjustunud maksas CD166 ja Sox9 resideeruvad lisaks sapiteedele ka parenhüümirakkudes. Seega võib eeldada, et need markerid omavad rakkudes ka ehk muid funktsioone peale tüvirakkudele iseloomulike ülesannete.

Ekstratsellulaarse maatriksi levik ja koostise muutumine on tavapärane vastus kahjustustele ning see mängib olulist rolli maksapuudulikkuse tekkel. Selles töös näidati, et maksa tüvirakud kolokaliseeruvad ekstratsellulaarse maatriksi basaalmembraanis oleva laminiini  $\alpha$ -5 ahelaga olenemata maksakahjustuse astmest, mis võib viidata LM511 olulisele rollile tüviraku niši tekkel ja tüvirakkude eriliste omaduste säilitamisel. On alust arvata, et ka  $\alpha$ -4 ja dekoriin võivad omada rolli maksa tüvirakkude niši reguleerimisel, kuna nende ekspressiooni detekteeriti kahjustunud maksas sapiteedes, kuid põhjalikumad katsed nende valkude täpse rolli määramiseks seisavad alles ees.

# **Characterization of liver stem cell surface markers and their surrounding extracellular matrix in normal and damaged tissue**

**Kristiina Patrael**

## **SUMMARY**

Cirrhosis of the liver and liver cancer are believed to be caused by regulatory disorders of liver stem cells. The proliferation and differentiation of liver stem cells are inhibited in case of cirrhosis, while in liver tumours one or more liver cell clones have acquired an uncontrolled ability for cell division.

Therefore, the large and unique liver parenchymal cells' proliferative ability after injury makes the liver an ideal organ to investigate the regeneration of cells in case of the acquired chronic disease.

The extracellular matrix (EM) is a fundamental component of the cell's microenvironment, and in addition to offering mechanical support and being a substrate for cell adhesion it also acts as a regulatory factor in normal and malignant tissue.

Accordingly, the main task of this thesis was to describe the expression of liver stem cell markers and the components of the liver stem cell niche in normal and injured liver. As a result, it was shown that liver stem cell markers, such as EpCAM, CD49f, CK19, P-cadherin, CD34 and CD24 are localized predominantly within the liver bile duct but some liver stem cell markers, such as CD133, CD44, Claudin-4, CD166 and Sox9, also resided in the parenchymal cells in damaged liver. It might be speculated that these markers label not only liver stem cells but also differentiated parenchymal cells, which are taking part in liver regeneration.

Furthermore, it was shown that liver stem cells colocalize with laminin  $\alpha$ -5, which is a component of the basal membrane. This colocalization was detectable regardless of the degree of liver injury that may indicate an important role of the LM511 in forming the stem cell niche and in maintaining the special properties of stem cells. There is a reason to believe that the laminin  $\alpha$ -4 and decorin may play a role in regulating of the liver stem cells' niche, as their expression was detected in the bile ducts of the damaged liver.

## **TÄNUSÕNAD**

Ma tänan südamest oma juhendajat Viljar Jaksi saadud uute teadmiste ja kogemuste ning igakülgse toetuse eest. Samuti tänan ka Sulev Ingerpuud, kes andis mulle uusi teadmisi.

## KASUTATUD KIRJANDUS

**Alison, M. R., Golding, M. H. and Sarraf, C. E.** (1996). Pluripotential liver stem cells: facultative stem cells located in the biliary tree. *Cell Prolif.* **29**:373-402.

**Alison, M. R., Islam, S. and Lim, S.** (2009). Stem cells in liver regeneration, fibrosis and cancer: the good, the bad and the ugly. *J Pathol.* **217**: 282–298.

**Aumailley, M., Bruckner-Tuderman, L., Carter, W. G., Deutzmann, R., Edgar, D., Ekblom, P., Engel, J., Engvall, E., Hohenester, E., Jones J. C. R., Kleinman, H. K., Marinkovich, M. P., Martin, G. R., Mayer, U., Meneguzzi, G., Miner, J. H., Miyazaki, K., Patarroyo, M., Paulsson, M., Quaranta, V., Sanes, J. R., Sasaki, T., Sekiguchi, K., Sorokin, L. M., Talts, J. F., Tryggvason, K., Uitto, J., Virtanen, I., von der Mark, K., Wewer, U. M., Yamada, Y. and Yurchenco, P. D.** (2005). A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol.* **24**:326-332.

**Badylak, S. F.** (2007). The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials.* **28**, 3587-3593.

**Bose, K., Nischt, R., Page, A., Bader, B. L., Paulsson, M and Smyth, N.** (2006) Loss of nidogen-1 and -2 results in syndactyly and changes in limb development. *J Biol Chem.* **281**:39620–39629.

**Boulter, L., Govaere, O., Bird, T. G., Radulescu, S., Ramachandran, P., Pellicoro, A., Ridgway, R. A., Seo, S. S., Spee, B., Van Rooijen, N., Sansom, O. J., Iredale, J. P., Lowell, S., Roskams, T. and Forbes, S. J.** (2012). Macrophage-derived Wnt opposes Notch signaling to specify hepatic progenitor cell fate in chronic liver disease. *Nat Med.* **18**(4):572–579.

**Celton-Morizur, S., Merlen, G., Couton, D. and Desdouets, C.** (2010). Polyploidy and liver proliferation. *Cell Cycle.* **9**(3):460-6.

**Chistiakov, D. A.** (2012). Liver regenerative medicine: advances and challenges. *Cells Tissues Organs.* **196**(4):291-312.

**Clevers, H. and Nusse, R.** (2012). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and disease. *Cell.* **149**(6):1192-205.

**Colognato, H. and Yurchenco, P. D.** (2000). Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev. Dyn.* **218**:213-234.

**Cruickshank, S. M., Southgate, J., Wyatt, J. I., Selby, P. J. and Trejdosiewicz, L. K.** (1999). Expression of CD44 on bile ducts in primary sclerosing cholangitis and primary biliary cirrhosis. *J Clin Pathol.* **52**:730–734.

- Dan, Y. Y., Riehle, K. J., Lazaro, C., Teoh, N., Haque, J., Campbell, J.S. and Fausto, N.** (2006). Isolation of multipotent progenitor cells from human fetal liver capable of differentiating into liver and mesenchymal lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**:9912-9917.
- Desmet, V.J.** (1994). Organizational principles. In the liver: Biology and pathology, p. 314. In I. M. Arias, J. L. Boyer, N. Fausto, W. B. Jakoby, D. A. Schachter, and D. A. Shafritz, (edi.), Raven Press, Ltd., New York.
- Discher, D. E., Mooney, D. J. and Zandstra, P. W.** (2009). Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science.* **324**(5935):1673-7.
- Duffield, J. S., Forbes, S. J., Constandinou, C.M., Clay, S., Partolina, M., Vuthoori, S., Wu, S., Lang, R. and Iredale, J. P.** (2005). Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest.* **115**(1):56-65.
- Dziadek, M. and Timpl, R.** (1985). Expression of nidogen and laminin in basement membranes during mouse embryogenesis and in teratocarcinoma cells. *Dev Biol.* **11**:372382.
- Ekblom, P.** (1989). Developmentally regulated conversion of mesenchyme to epithelium. *Faseb J.* **10**:2141-2150.
- Erickson, A. C. and Couchman, J. R.** (2000). Still more complexity in mammalian basement membranes. *J Histochem Cytochem.* **48**:1291–1306.
- Evarts, R. P., Nagy, P., Marsden, E. and Thorgeirsson, S. S.** (1987). A precursorproduct relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver. *Carcinogenesis.* **8**:1737-1740.
- Farber, E.** (1956) Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3'-methyl 4dimethylaminoazobenzene. *Cancer Re.* **16**:142-148.
- Fausto, N.** (2004). Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology.* **39**:1477-1487.
- Fausto, N.** (1990) Oval cells and liver carcinogenesis: an analysis of cell lineages in hepatic tumors using oncogene transfection techniques. *Prog. Clin. Biol. Ret.* **331**:325-334.
- Ferletta, M.** (2002). The Laminins and their Receptors. Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology 688. Acta Universitatis Upsaliensis. Uppsala.

**Floridon, C., Jensen, C. H., Thorsen, P., Nielsen, O., Sunde, L., Westergaard, J. G., Thomsen, S. G. and Teisner, B.** (2000). Does fetal antigen 1 (FA1) identify cells with regenerative, endocrine and neuroendocrine potentials? A study of FA1 in embryonic, fetal, and placental tissue and in maternal circulation. *Differentiation*. **66**:49-59.

**Fujiwara, H., Kikkawa, Y., Sanzen, N. and Sekiguchi, K.** (2001). Purification and characterization of human laminin-8. Laminin-8 stimulates cell adhesion and migration through  $\alpha 3\beta 1$  and  $\alpha 6\beta 1$  integrins. *J. Biol Chem*. 276:17550-17558.

**Furuyama, K., Kawaguchi, Y., Akiyama, H., Horiguchi, M., Kodama, S., Kuhara, T., Hosokawa, S., Elbahrawy, A., Soeda, T., Koizumi, M., Masui, T., Kawaguchi, M., Takaori, K., Doi, R., Nishi, E., Kakinoki, R., Deng, J. M., Behringer, R. R., Nakamura, T. and Uemoto, S.** (2011). Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nat Genet*. **43**(1):34-41.

**Geiger, B., Spatz, J. P. and Bershadsky, A. D.** (2009). Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10(1):21-33.

**Grisham, J. W. and Thorgeirsson, S. S.** (1996) Liver stem cells. In C.S. Potten (ed.), The Stem Cell Handbook, Academic Press, New York.

**Hall, D. E., Reichardt, L. E., Crowley, E., Holley, B., Moezzi, H., Sonnenberg, A. and Damsky, C. H.** (1990). The  $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha 6\beta 1$  integrin heterodimers mediate cell attachment to distinct sites on laminin. *J. Cell Biol*. **110**(6):2175-84.

**Hallmann, R., Horn, N., Selg, M., Wendler, O., Pausch, F. and Sorokin, L. M.** (2005). Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev*. **85**(3):979-1000.

**Hohenester, E. and Yurchenco, P. D.** (2013). Laminins in basement membrane assembly. *Cell Adh Migr*. 7(1):56–63.

**Horejs, C.-M., Serio, A., Purvis, A., Gormley, A. J., Bertazzo, S., Poliniewicz, A., Wang, A. J., Dimaggio, P., Hohenester, E. and Stevens, M. M.** (2014). Biologically-active laminin-111 fragment that modulates the epithelial-to-mesenchymal transition in embryonic stem cells. *PNAS*. vol. 111 no. 16 5908-591.

**Hsia, C. C., Evarts, H. P., Nakatsukasa, N., Maraden, E. H. and Thorgeirson, S.S.** (1992) Occurrence of oval-type cells in hepatitis B virus-associated human hepatocarcinogenesis. *Hepatology*. **16**(6):1327-33.

**Hynes, R. O.** (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. **110**(6):673-87.

**Kahsai, T. Z., Enders, G. C., Gunwar, S., Brunmark, C., Wieslander, J., Kalluri, R., Zhou, J., Noelken, M. E. and Hudson, B. G.** (1997). Seminiferous tubule basement membrane. Composition and organization of type IV collagen chains, and the linkage of  $\alpha 3(\text{IV})$  and  $\alpha 5(\text{IV})$  chains. *J Biol Chem.* **272**(27):17023-32.

**Kalluri, R., Shield, C. F., Todd, P., Hudson, B. G. and Neilson, E. G.** (1997). Isoform switching of type IV collagen is developmentally arrested in X-linked Alport syndrome leading to increased susceptibility of renal basement membranes to endoproteolysis. *J Clin Invest.* **99**(10):2470-8.

**Khuu, D. N., Najimi, M. and Sokal, E. M.** (2007). Epithelial cells with hepatobiliary phenotype: is it another stem cell candidate for healthy adult human liver? *World J Gastroenterol.* **13**(10):1554-60.

**Kikuchi, S., Griffin, C. T., Wang, S. S. and Bissell, D. M.** (2005). Role of CD44 in epithelial wound repair: migration of rat hepatic stellate cells utilizes hyaluronic acid and CD44v6. *J Biol Chem.* **280**(15):15398-404.

**Kinoshita, T., Sekiguchi, T., Xu, M. J., Ito, Y., Kamiya, A., Tsuji, K., Nakahata, T. and Miyajima, A.** (1999). Hepatic differentiation induced by oncostatin M attenuates fetal liver hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**(13):7265-70.

**Kmieć, Z.** (2001). Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* **161**: III–XIII, 1–151.

**Knittel, T., Janneck, T., Müller, L., Fellmer, P. and Ramadori, G.** (1996). Transforming growth factor beta 1-regulated gene expression of Ito cells. *Hepatology.* **24**(2):352-60.

**Lajtha, L. C.** (1970). Stem cell concepts. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* **21**(1):59-65.

**Lebleu, V.S., Macdonald, B. and Kalluri, R.** (2007). Structure and Function of Basement Membranes. *Exp Biol Med (Maywood).* **232**(9):1121-9.

**Lee, J. S., Heo, J., Libbrecht, L., Chu, I. S., Kaposi-Novak, P., Calvisi, D. F., Mikaelyan, A., Roberts, L. R., Demetris, A. J., Sun, Z., Nevens, F., Roskams, T. and Thorgeirsson, S. S.** (2006). A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nat. Med.* **12**(4):410-6.

**Lemire, J. M., Shiojin, N. and Fausto, N.** (1991) Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by D-galactosamine. *Am. J. Pathol.* **139**(3):535-52.

**Li, A., Pouliot, N., Redvers, R. and Kaur, P.** (2004). Extensive tissue-regenerative capacity of neonatal human keratinocyte stem cells and their progeny. *J Clin Invest.* **113**(3):390-400.



- Li, D., Zheng, L., Jin, L., Zhou, Y., Li, H., Fu, J., Shi, M., Du, P., Wang, L., Wu, H., Chen, G. Y., Zheng, P., Liu, Y., Wang, F. S. and Wang, S.** (2009). CD24 polymorphisms affect risk and progression of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*. **50**(3):735–42.
- Liu, Z. Z., Kumar, A., Ota, K., Wallner, E. I. and Kanwar, Y. S.** (1997). Developmental regulation and the role of insulin and insulin receptor in metanephrogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**(13):6758-63.
- Logan, C. Y. and Nusse, R.** (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **20**:781-810.
- Lorenzini, S., Bird, T. G., Boulter, L., Bellamy, C., Samuel, K., Aucott, R., Clayton, E., Andreone, P., Bernardi, M., Golding, M., Alison, M. R., Iredale, J. P. and Forbes, S. J.** (2010). Characterisation of a stereotypical cellular and extracellular adult liver progenitor cell niche in rodents and diseased human liver. *Gut*. **59**(5):645-54.
- MacDonald, B. T., Tamai, K. and He, X.** (2009) Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell*. **17**(1):9–26.
- Mao, L., Qiu, Y. D., Fang, S., Wu, Y. F., Liu, H. and Ding, Y. T.** (2008). Liver progenitor cells activated after 30% small-for-size liver transplantation in rats: a preliminary study. *Transplant Proc.* **40**(5):1635-40.
- Marceau, N.** (1990) Biology of disease. Cell lineages and differentiation programs in epidermal; urothelial and hepatic tissues and their neoplasms. *Lab. Invest.* **63**(1):4-20.
- Matheu, A., Collado, M., Wise, C., Manterola, L., Cekaite, L., Tye, A. J., Canamero, M., Bujanda, L., Schedl, A., Cheah, K. S., Skotheim, R. I., Lothe, R. A., López de Munain, A., Briscoe, J., Serrano, M. and Lovell-Badge, R.** (2012). Oncogenicity of the developmental transcription factor Sox9. *Cancer Res.* **72**(5):1301-15.
- Michalopoulos, G. K.** (2010). Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am. J. Pathol.* **176**(1):2-13.
- Miner, J. H., Li, C., Mudd, J. L., Go, G. and Sutherland, A. E.** (2004). Compositional and structural requirements for laminin and basement membranes during mouse embryo implantation and gastrulation. *Development*. **131**(10):2247-56.
- Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Gerger, B. and Krepler, R.** (1982). The catalog of human cytokeratins: pattern of expression in normal epithelia tumors and cultured cells. *Cell*. **31**(1):11-24.
- Moll, R., Löwe, A., Laufer, J. and Franke, W. W.** (1992). Cytokeratin 20 in human carcinomas, a new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol.* **140**(2):427-47.

- Nejak-Bowen, K. N. and Monga, S. P.** (2011). Beta-catenin signaling, liver regeneration and hepatocellular cancer: sorting the good from the bad. *Semin Cancer Biol.* **21**(1):44-58.
- Okabe, M., Tsukahara, Y., Tanaka, M., Suzuki, K., Saito, S., Kamiya, Y., Tsujimura, T., Nakamura, K. and Miyajima, A.** (2009). Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse liver. *Development.* **136**(11):1951-1960.
- Ozaki, I., Yamamoto, K., Mizuta, T., Kajihara, S., Fukushima, N., Setoguchi, Y., Morito, F. and Sakai, T.** (1998). Differential expression of laminin receptors in human hepatocellular carcinoma. *Gut.* **43**(6): 837–842.
- Overturf, K., al-Dhalimy, M., Ou, C. N., Finegold, M. and Grompe, M.** (1997). Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am. J. Pathol.* **151**(5):1273-1280.
- Paku, S., Schnur, J., Nagy, P. and Thorgeirsson, S. S.** (2001). Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver. *Am. J. Pathol.* **158**(4):1313-23.
- Patarroyo, M., Tryggvason, K. and Virtanen, I.** (2002). Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. *Semin Cancer Biol.* **12**(3):197-207.
- Paulsson, M.** (1992). Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **27**(1-2): 93–127.
- Petersen, B. E., Bowen, W. C., Patrene, K. D., Mars, W. M., Sullivan, A. K., Murase, N., Boggs, S. S., Greenberger, J. S. and Goff, J. P.** (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science.* **284**(5417):1168-70.
- Poschl, E., Schlotzer-Schrehardt, U., Brachvogel, B., Saito, K., Ninomiya, Y. and Mayer, U.** (2004). Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development.* **131**(7):1619–1628.
- Potten, C. S. and Loeffler, M.** (1990) Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. *Development.* **110**(4):1001-20.
- Rhim, J. A., Sandgren, E. P., Degen, J. L., Palmiter, R. D. and Brinster, R. L.** (1994). Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. *Science.* **263**(5150):1149-52.
- Riener, M. O., Voetseder, A., Pestalozzi, B. C., Clavien, P. A., Probst-Hensch, N., Kristiansen, G. and Jochum, W.** (2010). Cell adhesion molecules P-cadherin and CD24 are markers for carcinoma and dysplasia in the biliary tract. *Hum Pathol.* **41**(11):1558-65.

- Rodin, S., Domogatskaya, A., Ström, S., Hansson, E. M., Chien, K. R., Inzunza, J., Hovatta, O. and Tryggvason, K.** (2010). Long-term self-renewal of human pluripotent stem cells on human recombinant laminin511. *Nat Biotechnol.* **28**(6):611-5.
- Roskams, T., Libbrecht, L. and Desmet, V.** (2003a). Progenitor cells in diseased human liver. *Semin Liver Dis.* **23**(4):385–396.
- Roskams, T., Yang, S. Q., Koteish, A., Durnez, A., DeVos, R., Huang, X. Achten, R., Verslype, C. and Diehl, A. M.** (2003b). Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Pathol.* **163**(4):1301–1311.
- Roskams, T. A., Theise, N. D., Balabaud, C., Bhagat, G., Bhathal, P. S., Bioulac-Sage, P., Brunt, E. M., Crawford, J. M., Crosby, H. A., Desmet, V., Finegold, M. J., Geller, S. A., Gouw, A. S., Hytioglou, P., Knisely, A. S., Kojiro, M., Lefkowitz, J. H., Nakanuma, Y., Olynyk, J. K., Park, Y. N., Portmann, B., Saxena, R., Scheuer, P. J., Strain, A. J., Thung, S. N., Wanless, I. R. and West, A. B.** (2004). Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology.* **39**(6):1739-1745.
- Schofield, R.** (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells.* **4**(1-2):7-25.
- Seiichi, Y., Yoh, Z., Takahiko, F., Yasunori, S., Tetsuo, O., Yutaka A. and Yasuni, N.** (2009). Characterization of CD133<sup>+</sup> parenchymal cells in the liver: Histology and culture. *World J Gastroenterol.* **15**(39): 4896–4906.
- Sell, S.** (1990) Is there a liver stem cell? *Cancer Ret.* **50**(13):3811-5.
- Sigal, S. H., Brill, S. and Reid, L. M.** (1992). The liver as a stem cell and lineage system. *Am. J. Physiol.* **263**(2 Pt 1):G139-48.
- Smithuis, R.** (2014). Anatomy of the liver segments. *Radiology Assistant.*
- Stanley, J. R., Woodley, D. T., Katz, S. I. and Martin, G. R.** (1982). Structure and function of basement membrane. *J Invest Dermatol.* 79 Suppl 1:69s-72s.
- Streuli, C. H. and Bisell, M. J.** (1990). Expression of extracellular matrix components is regulated by substratum. *J. Cell Biol.* **110**(4):1405-15.
- Suetsugu, A., Nagaki, M., Aoki, H., Motohashi, T., Kunisada, T. and Moriwaki H.** (2006). Characterization of CD133<sup>+</sup> hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **351**(4):820-4.

- Surbek, D.V., Steinmann, C., Bürk, M., Hahn, S., Tichelli, A. and Holzgreve, W.** (2000). Developmental changes in adhesion molecule expressions in umbilical cord blood CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor and stem cells. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **183**(5):1152-7.
- Suzuki, A., Sekiya, S., Onishi, M., Oshima, N., Kiyonari, H., Nakauchi, H. and Taniguchi, H.** (2008). Flow cytometric isolation and clonal identification of self-renewing bipotent hepatic progenitor cells in adult mouse liver. *Hepatology.* **48**(6):1964-78.
- Theise, N. D., Saxena, R., Portmann, B. C., Thung, S. N., Yee, H., Chiriboga, L., Kumar, A. and Crawford, J. M.** (1999). The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology.* **30**(6):1425-33.
- Zorn, A. M.** (2008). Liver development. StemBook. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute.
- Tanaka, M., Okabe, M., Suzuki, K., Kamiya, Y., Tsukahara, Y., Saito, S. and Miyajima, A.** (2009). Mouse hepatoblasts at distinct developmental stages are characterized by expression of EpCAM and DLK1: drastic change of EpCAM expression during liver development. *Mech. Dev.* **126**(8-9):665-76.
- Tanaka, M., Itoh, T., Tanimizu, N. and Miyajima, A.** (2011). Liver stem/progenitor cells: their characteristics and regulatory mechanisms. *J Biochem.* **149**(3):231-9.
- Tzu, J. and Marinkovich, M.P.** (2008). Bridging structure with function: structural, regulatory, and developmental role of laminins. *Int J Biochem Cell Biol.* **40**(2): 199–214.
- Tunggal, P., Smyth, N., Paulsson, M. and Ott, M. C.** (2000). Laminins: structure and genetic regulation. *Microsc Res Tech.* **51**(3):214-27.
- Wang, X., Foster, M., Al-Dhalimy, M., Lagasse, E., Finegold, M. and Grompe, M.** (2003). The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100 Suppl 1:11881-8.
- Watt, F. M. and Hogan, B. L.** (2000). Out of Eden: stem cells and their niches. *Science.* **287**(5457):1427-30.
- Whetton, A. D. and Graham, G. J.** (1999). Homing and mobilization in the stem cell niche. *Trends Cell Biol.* **9**(6):233-8.
- Whittaker, C. A., Bergeron, K. F., Whittle, J., Brandhorst, B. P., Burke, R. D. and Hynes, R. O.** (2006). The echinoderm adhesome. *Dev. Biol.* **300**(1):252-66.
- Wilson, J. W. and Leduc, E. H.** (1958) Role of cholangiol in restoration of the liver of the mouse after dietary injury. *J Pathol Bacteriol.* **76**(2):441-9.

**Wurmser, A. E., Palmer, T. D. and Gage, F. H.** (2004). Neuroscience. Cellular interactions in the stem cell niche. *Science*. **304**(5675):1253-5.

**Xie, T. and Spradling, A. C.** (2000). A niche maintaining germ line stem cells in the *Drosophila* ovary. *Science*. **290**(5490):328-30.

**Yasoshima, M., Tsuneyama, K., Harada, K., Sasaki, M., Gershwin, M. E. and Nakanuma, Y.** (2000). Immunohistochemical analysis of cell-matrix adhesion molecules and their ligands in the portal tracts of primary biliary cirrhosis. *J Pathol*. **190**(1):93-9.

**Yin, A. H., Miraglia, S., Zanjani, E. D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M., Leary, A. G., Olweus, J., Kearney, J. and Buck, D. W.** (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. **90**(12):5002-12.

**Yoshikawa, S., Zen, Y., Fujii, T., Sato, Y., Ohta, T., Aoyagi, Y. and Nakanuma, Y.** (2009). Characterization of CD133<sup>+</sup> parenchymal cells in the liver: Histology and culture. *World J Gastroenterol*. **15**(39):4896-906.

**Yousif, L. F., Di Russo J. and Sorokin L.** (2013). Laminin isoforms in endothelial and perivascular basement membranes. *Cell Adh Migr*. **7**(1):101-10.

**Yovchev, M. I., Grozdanov, P. N., Joseph, B., Gupta, S. and Dabeva, M. D.** (2007). Novel hepatic progenitor cell surface markers in the adult rat liver. *Hepatology*. **45**(1):139-49.

**Yurchenco, P. D.** (2011). Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. **3**(2).

**Yurchenko, P. and Batton, B. L.** (2009). Developmental and Pathogenic Mechanisms of Basement Membrane Assembly. *Curr Pharm Des*. **15** (12):1277–94.

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Kristiina Patrael

(isikukood: 48701226544)

1. Annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose: Maksa tüvirakkude pinnamarkerite ja neid ümbritseva ekstratsellulaarse maatriksi iseloomustamine normaalses ja kahjustatud koes, mille juhendaja on Viljar Jaks.

1.1. Reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. Üldsusele kättesaadavaks tegemiseks ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 01.07.2015 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014.

Kristiina Patrael